

KATHERINE DE SOUZA RODRIGUES

POLIMORFISMO rs2736100 DO GENE hTERT EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
MAMA

BRASÍLIA, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KATHERINE DE SOUZA RODRIGUES

POLIMORFISMO rs2736100 DO GENE hTERT EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
MAMA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. João Nunes de Matos Neto

BRASÍLIA 2017

KATHERINE DE SOUZA RODRIGUES

MESTRE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 30 de janeiro de 2017

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira – presidente  
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra – membro  
Universidade de Brasília

Profª Dr.a Izabel Cristina Rodrigues da Silva – membro  
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo– suplente  
Universidade de Brasília

*À minha mãe,  
o maior tesouro que tenho nessa Terra.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Diêgo, que me incentivou a começar minha jornada como pesquisadora. Por cada vez que pacientemente abriu mão do seu tempo para sentar e me ensinar tudo no mínimo detalhe, pelas palavras de consolo e conforto nos momentos de desespero e por me ajudar a seguir em frente. “Cada pedra no caminho só deixa mais prazerosa a vitória”. É, você tinha razão.

Aos meus pais, Terezinha e Romeu, que continuam me tratando como a filhinha do coração. Pelo apoio, amor, força e orações. Nos momentos onde todos os experimentos estavam dando errado o abraço de vocês era meu paraíso.

Ao Rael, Gui e demais familiares (tios, primos e avó), por cada momento de comunhão e diversão, principalmente pelo carinho e cuidado que demonstram por mim.

Aos meus amigos Alan, Amanda, Amani, Dayane, Mateus, Paola, Wesley e Wilker. Vocês foram mais que amigos, principalmente nos momentos que dava vontade de “chutar o balde”. Alan, pelas vezes que me acompanhou até a noite no laboratório, foi muito bom ter a sua companhia. E Rebeca Guerra, obrigada pelo seu discipulado, ele me ensina sobre a coisa mais preciosa da vida: ter intimidade com Deus.

A todos do laboratório de análises clínicas, professores, técnicos e alunos de pesquisa, que me ajudaram de alguma maneira, principalmente ao Prof. Rodrigo Haddad e a Prof. Izabel Silva, que me ensinaram muitas técnicas e me acudiam quando o Diêgo não estava presente. Não posso deixar de citar o grupo mais legal de pesquisa, pessoal do PIBIC do Diêgo. Nossas conversas entre os experimentos e auto-clavagens davam mais graça ao dia. Aprendi muito com vocês, especialmente com você, Karol.

Ao Dr João Nunes, Miriam, Karla e Cris (Cetro), por todo apoio com a pesquisa.

À Fundação de Apoio à pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo suporte financeiro e ao Cetro e Sabin pela parceria com a pesquisa.

À Deus, que como um pai super amoroso cuidou de cada dia até aqui e tornou tudo isso possível. “Ai de mim se não fosse o amor do meu Deus; eu não ia dar em nada”. Contigo me sinto a pessoa mais livre e completa do universo!

Foram dois anos de muito aprendizado, amadurecimento profissional e pessoal. À todos vocês que participaram desse episódio magnífico, muito obrigada!

## RESUMO

O câncer de mama é o mais comum em mulheres e é responsável por 23% dos novos casos de câncer. O seu diagnóstico precoce assume papel decisivo para um melhor prognóstico devido à sua etiopatogenia complexa e multifatorial, já que não pode ser prevenido. Desta forma, os esforços para melhoria dos indicadores do câncer de mama são direcionados na busca por medidas que antecipem seu diagnóstico. A telomerase, uma enzima importante no processo de carcinogênese, está presente na maioria dos tumores e apresenta indícios de ser um bom marcador molecular, por isso deve ser estudada para avaliar sua relação com o câncer de mama. Este estudo analisou o polimorfismo rs2736100 da telomerase em pacientes com câncer de mama e testou a correlação de tais dados com o prognóstico e variáveis clínicas diversas. Para isso, o DNA de pacientes com câncer de mama foi extraído, submetido a PCR com os primers da região do polimorfismo e sequenciado. Ao todo, 119 pacientes com câncer de mama aceitaram participar do estudo. Foi encontrada associação em diversas características gerais do paciente (altura, idade e IMC) e características do tumor (RE, RP e Ki67), reafirmando a importância deles na clínica para a definição do melhor e mais fidedigno prognóstico. Através do sequenciamento foi identificada a região do polimorfismo rs2736100 da telomerase em 63 amostras, divididos entre aqueles com detecção do genótipo GG e AG. Foi encontrada uma deleção em 11,11% da população estudada que ainda não foi relatada na literatura. Nosso estudo demonstrou que este polimorfismo tem algumas associações com variáveis clínicas e de prognóstico do câncer de mama. Entretanto, para o polimorfismo rs2736100 da telomerase ser utilizado como marcador prognóstico no câncer de mama estudos mais detalhados devem ser realizados para confirmar seu valor clínico.

**Palavras-chave:** câncer de mama; telomerase; polimorfismo; rs2736100; TERT.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common in women and accounts for 23% of new cases of cancer. Its early diagnosis plays a decisive role for a better prognosis because of its complex and multifactorial etiopathogenesis, which can not be prevented. Thus, efforts to improve indicators of breast cancer are targeted seeking measures that anticipate their diagnosis. Telomerase, an important enzyme in the carcinogenesis process, is present in most tumors and shows signs of being a good molecular marker, so it should be studied to evaluate its relationship with breast cancer. This study analyzed the rs2736100 polymorphism of telomerase in breast cancer patients and tested the correlation of such data with the prognosis and various clinical variables. For this, the DNA of patients with breast cancer was extracted, subjected to PCR with primers and sequenced region of the polymorphism. In all, 119 breast cancer patients agreed to participate in the study. An association was found in several general patient characteristics (height, age and BMI) and tumor characteristics (ER, PR and Ki67), reaffirming their importance in clinical settings for the definition of the best and most reliable prognosis. Through sequencing the telomerase rs2736100 polymorphism region was identified in 63 samples, divided among those with GG and AG genotype detection. A deletion was found in 11.11% of the studied population that has not yet been reported in the literature. Our study demonstrated that this polymorphism has some associations with clinical and prognostic variables of breast cancer. However, for the rs2736100 polymorphism of telomerase to be used as a prognostic marker in breast cancer more detailed studies should be performed to confirm its clinical value.

**Keywords:** breast cancer; telomerase; polymorphism; rs2736100; TERT.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização dos tipos mais comuns de câncer de mama, CDI e CLI.....	19
Figura 2 – Esquema representativo da perda do telômero durante a divisão celular e sua recuperação pela enzima telomerase.....	25
Figura 3 - TERT e regiões de polimorfismos.....	27
Figura 4 – Critérios de inclusão e exclusão para definição da amostra.....	29
Figura 5 – Gel de agarose a 2% com marcador de 25kb mostrando a banda de 160 pb de 5 amostras de pacientes e controle negativo que foram submetidos a PCR.....	31
Figura 6 – Porcentagem de casos de câncer de mama de acordo com a faixa etária da idade ao diagnóstico.....	35
Figura 7 – Tamanho do tumor separado por faixas, em cm.....	37
Figura 8 – Itens da imunohistoquímica pós-cirúrgica não-concordante com biopsia pré-cirúrgica. ....	39
Figura 9 – Tipos de cirurgias e casos registrados.....	41
Figura 10 – Tipo de tumor associado a classificação histológica.....	43
Figura 11 – Associação entre Ki67 e altura .....	44
Figura 12 – Tipo de tumor associado a Ki67 alto e baixo.....	45
Figura 13 – Grau do tumor associado a Ki67 alto e baixo .....	46
Figura 14 – Número de linfonodos acometidos associado ao Ki67 alto e baixo .....	46
Figura 15 – Correlação entre os valores de RE e RP.....	47
Figura 16 – Associação entre RE e RP positivos e negativos .....	48
Figura 17 – Grau do tumor associado a RE positivo e negativo .....	49
Figura 18 – Grau do tumor associado a RP positivo e negativo .....	49
Figura 19 – Multifocalidade associada a RE positivo ou negativo.....	50
Figura 20 - Associação entre IMC e RP positivo ou negativo.....	51
Figura 21 – Associação entre IMC e estadiamento T do tumor.....	51
Figura 22 – Associação do tamanho do tumor em cm com o Grau do tumor.....	52
Figura 23 – Eletroferograma do sequenciamento de uma amostra com possível deleção para o polimorfismo rs2736100 da <i>hTERT</i> .....	54



Figura 24 - Associação entre genótipo e estadiamento T do tumor.....	55
Figura 25 - Associação entre os genótipo GG/AG e deleção ao tipo de tumor.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Informações gerais dos pacientes.....	34
<b>Tabela 2</b> – Grau do tumor e casos de recidiva.....	36
<b>Tabela 3</b> – Casos de imunohistoquímica pré-operatória.....	38
<b>Tabela 4</b> – Genótipos do polimorfismo rs2736100 e quantidade de casos.....	53
<b>Tabela 5</b> – Casos e frequência alélica para o polimorfismo rs2736100 .....	53

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diferenças biológicas entre tumores benignos e malignos.....	16
Quadro 2 – Tipos de câncer de mama.....	19
Quadro 3 – Classificação molecular do câncer de mama.....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Cettro	Centro de câncer de Brasília
CM	Câncer de mama
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CLI	Carcinoma lobular invasivo
BRCA1	Primeiro gene de predisposição ao câncer de mama
BRCA2	Segundo gene de predisposição ao câncer de mama
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotideo de DNA
ECM	Exame clínico da mama
HER2	receptor de crescimento epidérmico tipo 2
<i>hTERT</i>	Subunidade catalítica da telomerase humana
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer José de Alencar
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	proteína citoplasmática 53
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RE	Receptor de estrogênio
RH	Receptores hormonais
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
RNA	Ácido ribonucleico
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TaqDNA	Enzima polimerase que adiciona dNTP

<i>TERT</i>	Telomerase reverse transcriptase
<i>TERC</i>	Componente RNA da telomerase
UnB	Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
1.1. Câncer e Câncer de mama.....	15
1.2. Alterações moleculares no câncer de mama.....	20
1.3. Marcadores moleculares no câncer de mama.....	23
1.4. Marcadores moleculares associados à imortalização celular.....	24
1.5. Polimorfismo gênico e prognóstico.....	26
1.6. rs2736100.....	26
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
3.1. Coleta de sangue.....	29
3.2. Extração de DNA.....	30
3.3. Análise do polimorfismo.....	30
3.4. Coleta de dados clínicos.....	32
3.5. Análises estatísticas.....	32
<b>4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
4.1. Dados clínicos.....	34
4.2. Polimorfismo.....	52
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
<b>ANEXOS.....</b>	<b>66</b>
ANEXO A.....	66
ANEXO B.....	70
ANEXO C.....	71

## **1. Introdução e revisão bibliográfica**

### **1.1 Câncer e câncer de mama**

Câncer é um termo utilizado para definir uma série de doenças que tem em comum alterações moleculares que fazem com que as células assumam novas características, tais como crescimento e proliferação indiscriminada, podendo afetar quase qualquer parte do corpo (1,2). As células cancerosas podem se espalhar para outras partes do corpo através do sangue e sistema linfático (2), promovendo a invasão de tecidos circundantes, processo conhecido como metástase (1).

As causas do câncer são variadas e podem ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas estão relacionadas ao meio ambiente e aos hábitos próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são mutações aleatórias e predisposições genéticas. Esses fatores podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (3,4).

O câncer surge quando as células sofrem danos não-reparáveis no DNA que por variáveis mecanismos provoca uma mutação em um gene responsável pela regulação celular, gerando uma célula sem equilíbrio nos processos de proliferação e morte, iniciando assim a formação de neoplasias - mais usualmente reconhecidas como tumores (5,6). Define-se a neoplasia como sendo “uma proliferação anormal de tecido que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo, tendendo à autonomia e à perpetuação, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro” (7).

A nomenclatura da doença procede segundo o órgão ou o tipo de célula na qual o processo de carcinogênese é iniciado (4). A classificação mais utilizada para as neoplasias leva em consideração dois aspectos básicos: o comportamento biológico e a histogênese. De acordo com o comportamento biológico os tumores são divididos em benignos e malignos. Quando não é possível classificar entre os dois, adota-se o nome de tumores limítrofes ou borderline (7). Os critérios que permitem estabelecer com segurança a classificação são, na maioria dos casos, morfológicos (Quadro 1):

	BENIGNOS	MALIGNOS
<b>Encapsulação</b>	Geralmente não têm cápsulas verdadeiras, e sim pseudocápsulas fibrosas que se formam em decorrência da compressão dos tecidos vizinhos pelo crescimento lento e expansivo do tecido tumoral.	O crescimento rápido, desordenado e infiltrativo do tecido não permite a formação das pseudocápsulas.
<b>Crescimento</b>	Frequentemente exibem crescimento lento e expansivo, possuindo um estroma adequado, com um bom suprimento vascular, raramente mostrando necrose e hemorragia.	Pela rapidez e desorganização no crescimento, pelo caráter infiltrativo e pelo alto índice de multiplicação celular, geralmente apresentam uma desproporção muito grande entre o parênquima tumoral e o estroma vascularizado.
<b>Morfologia</b>	As células parenquimatosas são bem diferenciadas e reproduzem o aspecto das células do tecido original. Raramente observam-se atipias.	Apresentam menores graus de diferenciação e, conseqüentemente, não reproduzem as características dos tecidos que as originaram.
<b>Mitoses</b>	As figuras de mitose são raras e todas têm aspecto típico.	São vistas em maior número e podem ter aspecto atípico.
<b>Antigenicidade</b>	Não apresentam a capacidade de produzir antígenos.	Apresentam antígenos, permitindo a identificação de alguns antígenos tumorais.
<b>Metástase</b>	Não apresentam a capacidade de realizar metástase.	Têm capacidade de invasão e disseminação (metástase).

Quadro 1 – Diferenças biológicas entre tumores benignos e malignos (Fonte: Adaptado de INCA (7))

Outro sistema de classificação usualmente utilizado é o sistema TNM, utilizado para a classificação dos tumores malignos. O sistema TNM descreve a extensão anatômica da doença por base na avaliação de três componentes: T - a extensão do tumor primário N - a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais M - a ausência ou presença de metástase à distância. A adição de números a estes três componentes indica a extensão da doença maligna. Dentre os principais benefícios do seu uso, temos: ajuda no planejamento do tratamento, fornece alguma indicação do prognóstico, avalia os resultados de tratamento, facilita a troca de informações entre os centros de tratamento e contribui para a pesquisa contínua sobre o câncer (8).

Muitos tipos de câncer podem ser prevenidos, evitando-se a exposição a fatores de risco comuns. Além disso, uma percentagem significativa de tipos de cânceres podem ser curados, especialmente se forem detectados precocemente (1). O



diagnóstico do câncer é realizado através de acompanhamento clínico e laboratorial. Os sinais e sintomas que aparecem no indivíduo estão relacionados a (9):

- localização e pressão sobre as estruturas adjacentes;
- atividade funcional alterada (síntese de substâncias);
- sangramento e infecções secundárias quando ulceram através de estruturas adjacentes naturais;
- início de sintomas agudos provocados tanto pela sua ruptura como infarto.

Diante da complexidade das manifestações clínicas do câncer, é necessário que o processo de diagnóstico seja conduzido ordenada e objetivamente (9). Esse processo pode incluir:

- métodos histológicos e citológicos: excisão ou biópsia, aspiração com agulha e esfregaços para citologia.

- imuno-histoquímica: utiliza anticorpos monoclonais para a identificação de produtos celulares ou de marcadores de superfície. A técnica é utilizada para categorização de tumores malignos indiferenciados, categorização das leucemias e linfomas, determinação do local de origem dos tumores metastáticos e detecção de moléculas com significado terapêutico ou prognóstico.

- diagnóstico molecular: para diferenciação e prognóstico de neoplasmas malignos, detecção da doença residual mínima (presença mínima ou recidiva da doença), predisposição hereditária ao câncer, análise de microarranjo do DNA e proteomas.

- citometria de fluxo: mede rápida e quantitativamente diversas características celulares individuais, como antígenos de membrana e o conteúdo do DNA das células do tumor. Utilizada na classificação das leucemias e linfomas e no prognóstico de diversos tipos de câncer.

- marcadores tumorais: utilizados para confirmar diagnóstico e determinar a resposta ao tratamento e na indicação da recidiva durante o período de acompanhamento.

O câncer de mama (CM) ou carcinoma mamário é o resultado de multiplicações desordenadas de determinadas células que se reproduzem em grande velocidade, desencadeando o aparecimento de tumores ou neoplasias malignas que podem vir a

afetar os tecidos vizinhos e provocar metástases. Este tipo de câncer aparece sob forma de nódulos (10). Mais de 80% dos cânceres de mama têm origem no epitélio ductal, enquanto a minoria se origina do epitélio lobular (11), e caracterizam-se como neoplasias heterogêneas, com vários subtipos patológicos e diferentes aspectos histológicos, além de apresentações clínicas diferentes com diversas variações de respostas ao tratamento (12). Dentre os fatores relacionados à promoção do câncer de mama temos como os mais comuns: a idade, sendo mais comum a partir dos 40 anos, uso abusivo de hormônios e primeira gestação após os 30 anos de idade (13,14). Outros fatores relevantes são história familiar ou pessoal de CM, maior densidade do tecido mamário, hiperplasia mamária atípica, exposição a altas doses de radiação, menarca precoce, menopausa tardia e ausência ou curtos períodos de amamentação (14,15).

No Brasil a estimativa para o ano de 2017 aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer, sendo o câncer de pele do tipo não melanoma (180 mil) o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (61 mil) e mama feminina (58 mil) (16). Mundialmente, o câncer de mama é o mais comum em mulheres e é responsável por 23% dos novos diagnósticos de câncer (17).

As recomendações do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para rastreamento e detecção do câncer de mama são: 1. Exame clínico da mama (ECM) em mulheres a partir dos 40 anos de idade; 2. ECM mais exame mamográfico bianual em mulheres de 50 a 69 anos de idade; e, 3. ECM mais exame mamográfico anual em mulheres com risco elevado a partir dos 35 anos de idade (18).

Apesar de ser considerado um câncer com relativo bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente (10), as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil (11), provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. O diagnóstico do câncer de mama precoce assume papel decisivo para um melhor prognóstico devido à sua etiopatogenia complexa e multifatorial, já que não pode ser prevenido. Desta forma, os esforços para melhoria dos indicadores do câncer de mama são direcionados na busca por medidas que antecipem seu diagnóstico, minimizando a agressividade do tratamento

administrado e reduzindo as taxas de mortalidade, sendo estas medidas classificadas como prevenção secundária (19,20).

Sobre os tipos de cânceres de mama, a maioria são carcinomas - começam nas células que revestem os órgãos e tecidos (células epiteliais). O carcinoma mamários começa nos ductos (os ductos do leite) ou nos lóbulos (glândulas produtoras de leite) – Figura 1. Existem outros tipos de cânceres de mama, como sarcomas, que começam nas células do músculo, gordura ou tecido conjuntivo. Às vezes, um único tumor de mama pode ser uma combinação de diferentes tipos; em alguns tipos muito raros as células cancerosas podem não formar um nódulo ou tumor em tudo (21).

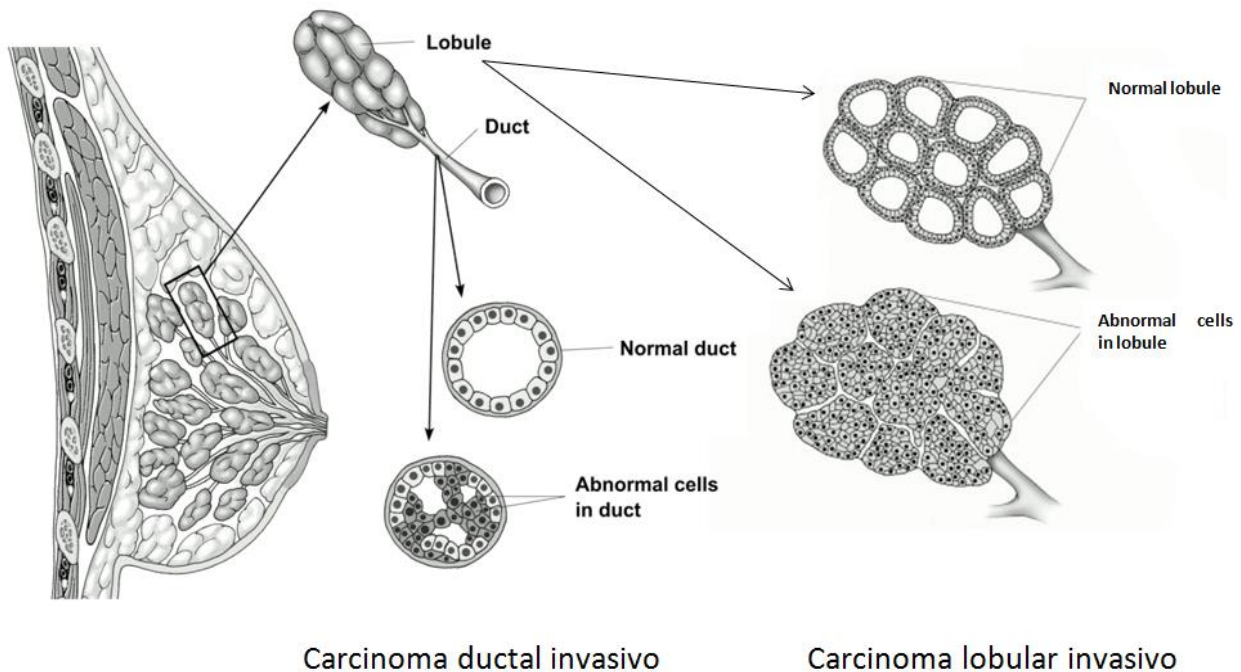


Figura 1 – Localização dos tipos mais comuns de câncer de mama, CDI E CLI (Fonte: Adaptado de 21)

Os tipos mais comuns de câncer de mama são carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo e carcinoma lobular invasivo – Quadro 2. O *in situ* não se espalha, já o invasivos ou infiltrando se espalha para o tecido mamário circundante (21).

Quadro 2 – Tipos de câncer de mama

Tipos comuns	
Carcinoma ductal in situ (CDIS)	Conhecido como carcinoma intraductal, é um câncer de mama não-invasivo ou pré-invasivo.
Carcinoma lobular in situ (CLIS)	Pode ser chamado de neoplasia lobular. As células

	que parecem cancerosas estão crescendo nos lóbulos das glândulas produtoras de leite da mama, mas não crescem através da parede dos lóbulos.
Carcinoma ductal invasivo (ou infiltrante)	O tipo mais comum de câncer de mama. Inicia-se em um ducto de leite da mama mas atravessa a parede do ducto e cresce no tecido adiposo da mama.
Carcinoma lobular invasivo (ou infiltrante)	Inicia-se nas glândulas produtoras de leite (lóbulos). Como o CDI, ele pode se espalhar para outras partes do corpo.
<b>Tipos especiais</b>	
Carcinoma adenóide cístico (ou adenocístico)	Carcinoma mucinoso (ou coloide)
Carcinoma adenosquamous de baixo grau	Carcinoma papilar ou micropapilar
Carcinoma medular	Carcinoma tubular
Carcinoma metaplásico	Carcinoma misto
<b>Tipos raros</b>	
Câncer de mama inflamatório	Um tipo incomum de câncer de mama invasivo. Representa cerca de 1% a 3% de todos os cânceres de mama.
Doença de Paget do mamilo	Começa nos dutos da mama e se espalha para a pele do mamilo e, em seguida, para a aréola. Representa cerca de 1% de todos os casos de câncer da mama.
Tumor de Phyllodes	Desenvolve no tecido conjuntivo (estroma) da mama, em contraste com carcinomas, que se desenvolvem nos ductos ou lóbulos.
Angiossarcoma	Inicia-se em células que alinham vasos sanguíneos ou vasos linfáticos

(Fonte: Adaptado de 21)

## 1.2 Alterações moleculares no câncer de mama

Já foi dito que no processo de iniciação do câncer vários mecanismos alteram a regulação do sistema de crescimento e morte celular. Entre esses mecanismos pode-se observar o acúmulo de mutações, instabilidades cromossômicas e alterações epigenéticas capazes de modificar a taxa de proliferação celular e danificar o sistema de reparo do DNA (12). Um dos maiores desafios para o estudo e tratamento do câncer de mama é a resolução da heterogeneidade tumoral característica destes carcinomas (13).

A classificação morfológica utilizada pode ser falha na tentativa de caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estágio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia. A limitação dessa classificação pode estar relacionada a não consideração das características biológicas destes tumores (12,22). Uma análise molecular do tumor pode gerar

informações importantes para a definição de um tratamento específico para determinados tipos dessa neoplasia, por exemplo, uma vez que estas possuem características distintas entre si (23). Os principais genes no contexto do câncer de mama já utilizados são o BRCA1, BRCA2, p53, PTEN e HER2 (24).

BRCA1 e BRCA2, genes supressores de tumor com elevada penetrância que são transmitidos por herança autossômica dominante, codificam fatores de transcrição, participam de uma via de reparo de DNA (13) e sua inativação contribui para a instabilidade genômica (23). A mutação do gene BRCA1, localizado no braço longo do cromossomo 17, e o gene BRCA2, localizado no braço longo do cromossomo 13, aumentam de forma significativa o risco de câncer (17). Grande parte dos casos de câncer de mama hereditário resulta de mutações germinativas nesses genes (23). De todos os casos de cânceres de mama, 5 a 10% estão associados a alterações genéticas por mutações dos genes BRCA1 e BRCA2 (17).

Outros genes cujas mutações têm sido associadas a tumores mamários observados em síndromes hereditárias são os genes p53 (síndrome de Li-Fraumeni) e PTEN (síndrome de Cowden) (17). O p53 é ativado em resposta a sinais de danos celulares e codifica um fator de transcrição que interage com outros genes para parar o ciclo celular na fase G1, antes que ocorra a replicação do DNA na fase S, dando tempo para que ocorra o reparo do DNA danificado. A resposta alternativa do p53 a um DNA danificado é indução da apoptose (23). Assim ele atua como um gene supressor de tumor e sua mutação leva a perda de função, podendo levar à formação de um tumor por não interromper a replicação de DNA danificado. As mutações no gene p53 ocorrem em mais de 50 tipos diferentes de tumores e mais de 1000 mutações neste gene são atualmente conhecidos (16,23). A presença de mutações p53 em tumores, especialmente os de cólon e de mama, indica um câncer muito agressivo com poucas chances de sobrevivência (23).

O HER2 é uma proteína com papel importante no crescimento e desenvolvimento de várias células. O gene *HER2*, responsável pela proteína, é um proto-oncogene e está localizado no braço longo do cromossomo 17. Portanto erros relacionados a esse gene favorecem o desenvolvimento do câncer, pois será produzida mais proteínas que transmitem sinal para crescimento celular superiores às células

normais. É um importante marcador de tratamentos oncológicos, especialmente para o câncer de mama (12,17,22).

O Ki67 também é utilizado como marcador e indica proliferação celular. É um antígeno nuclear presente nas fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M) e ausente na fase de repouso celular (G0) (25,26). A proteína está associada com alto grau de indiferenciação tumoral e tem correlação positiva com metástase, morte por neoplasia e baixa sobrevida sem doença, indicando um pior prognóstico (25,26,27). Na clínica o Ki67 é utilizado para ajudar a classificar o câncer (Luminal A e B) e considera-se grau de proliferação baixo quando é inferior a 15%, intermediário de 16 a 30% e um alto grau quando é superior a 30% (28).

Através da ligação de subtipos tumorais e conceitos moleculares e correlacionando-os com parâmetros clínicos relevantes (como o tempo de sobrevida e o tempo livre de doença), criou-se a classificação desses carcinomas em cinco grupos (Quadro 3): luminal A, luminal B, superexpressão do HER2, basal e normal breast-like (12,22).

SUBTIPO	FENÓTIPO	CARACTERIZAÇÃO	PROGNÓSTICO
<b>Luminal A</b>	RE e RP positivo e HER2 negativo	Elevada expressão de genes representados pelas células epiteliais luminais	Está associado à assinatura de melhor prognóstico e responde à terapêutica com antiestrogênicos
<b>Luminal B</b>	RE positivo, RP e HER2 positivo ou negativo	Baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais	Associado a pior prognóstico, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (subtipos superexpressão do HER2 e basal)
<b>Superexpressão do HER2</b>	RE negativo e HER2 positivo	Superexpressão de uma das moléculas da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico, o HER2	Importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de mama. Estes tumores apresentam boas respostas a drogas que bloqueiam a atividade do HER2, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal trastuzumab
<b>Basal</b>	"triplo negativo" (RE, RP, HER2)	Expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células basais/mioepiteliais	Associação com pior prognóstico e carece de tratamento específico

<b>Normal breast-like</b>	-	Aumento da expressão de genes comumente expressos pelo tecido adiposo e por outros tipos de células não epiteliais. Forte expressão para genes epiteliais basais e baixa expressão para genes do epitélio luminal.	Não está clara sua distinção nem seu valor clínico
-------------------------------	---	--	--

Quadro 3 – Classificação molecular do câncer de mama (Fonte: 12,22,23)

Apesar da colaboração que esse método de classificação trouxe ao tratamento do câncer de mama, ainda é necessário melhorar os diagnósticos para direcionar condutas terapêuticas mais individualizadas, especialmente às pacientes com perfil basal, que está relacionado com um pior prognóstico e com um curso da doença mais agressivo, por não ter uma terapia eficaz (12).

As variações nas características moleculares de um mesmo tipo de câncer mostraram a importância de se tomar medidas preventivas ou definir tratamentos levando em consideração as características individuais (29) e tornou a busca por novos alvos terapêuticos, nos vários subtipos moleculares de câncer de mama, um dos principais objetivos na investigação molecular do câncer de mama (30). Essa evolução entre a melhora no diagnóstico e criação de terapias adaptada ao genoma individual acontece principalmente através do desenvolvimento do campo da farmacogenômica (12).

### 1.3 Marcadores moleculares no câncer de mama

Vários fatores têm sido estudados com a finalidade de se estabelecer critérios para uma avaliação objetiva do prognóstico das pacientes com câncer de mama. É consenso que o estadiamento avançado da doença se encontra associado a uma pior sobrevida (31). As características histopatológicas do câncer de mama, incluindo o tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, metástases, grau e tipo histológico, são importantes determinantes para o prognóstico, mas a utilização de marcadores moleculares em vários processos biológicos relacionados à doença pode aumentar a especificidade da determinação do subtipo de câncer (32).

Atualmente o estudo da expressão desses marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama tem se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina

diagnóstica e de pesquisa, sendo a imuno-histoquímica a técnica ainda mais usual nesse âmbito (25). Como resultado pode-se, por exemplo, definir o tratamento mais adequado, através dos tumores que expressam receptores (HER2, RE, RP). Neste cenário entram as terapias dirigidas contra alvos moleculares específicos. Um subgrupo específico de câncer de mama desperta especial interesse, por ainda ser órfão de tratamento direcionado, o basal ou triplo-negativo. Neste grupo de tumores, as células não apresentam em sua superfície a expressão de RE, RP ou HER2 (22,33,34).

Portanto, fica claro que na pesquisa sobre o câncer de mama é importante buscar novos marcadores moleculares que facilite diagnósticos e terapias de forma cada vez mais especializada e adequada (13).

#### **1.4 Marcadores moleculares associados à imortalização celular**

Cada vez que o DNA de um cromossomo é duplicado para a mitose, ele perde um pequeno segmento da sua porção terminal - o telômero, porção que contém sequências altamente repetitivas de DNA (repetições TTAGGG) (35). Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas especiais e são essenciais para proteger terminais cromossômicos contra a degradação, fusão e rearranjo de ponta a ponta (30,36). Assim, quanto mais vezes uma linhagem celular se divide, mais o tamanho do telômero de seus cromossomos diminui, até que atingem um tamanho mínimo que limita novas divisões celulares porque o DNA não pode mais ser duplicado – processo de senescência celular (35).

Vários estudos têm relatado que o comprimento dos telômeros em tecidos de tumores sólidos pode ser um potencial marcador de prognóstico (37,38). Além disso, o encurtamento do telômero está associado a diversos fatores prognósticos do câncer de mama (39). Segundo estudo realizado por SHEN e colaboradores (32), o comprimento dos telômeros em leucócitos de sangue periférico pode transportar informações sobre o prognóstico do câncer de mama e o maior comprimento dos telômeros foi associado a um pior prognóstico em relação ao comprimento dos telômeros mais curtos. Têm sido associados ao comprimento dos telômeros, a expressão e estágio do tumor, a gravidade da progressão do CM (*TERF2*), doença recorrente (*TERC*) e previsão de sobrevida global e livre de doença (*TERC*) (32).



A telomerase reconhece a hidroxila 3' (3'OH) na extremidade da saliência da cadeia G do telômero e adiciona sequências de repetição nas extremidades cromossômicas (30) – Figura 2. Sua função de reconstruir os telômeros após cada ciclo mitótico tem importantes efeitos sobre as células (31). A telomerase funcional é composta pela proteína *TERT* (do termo em inglês “*telomerase reverse transcriptase*”, ou transcriptase reversa da telomerase) e pelo componente de RNA de telomerase (*TERC*) que atua como um molde para a síntese de DNA. O produto do gene *TERT* contém três domínios estruturais distintos: o domínio de ligação ao RNA (TRBD), o domínio da transcriptase reversa e a extensão carboxi-terminal (CTE), que representa o domínio putativo do polegar de *TERT* (30).

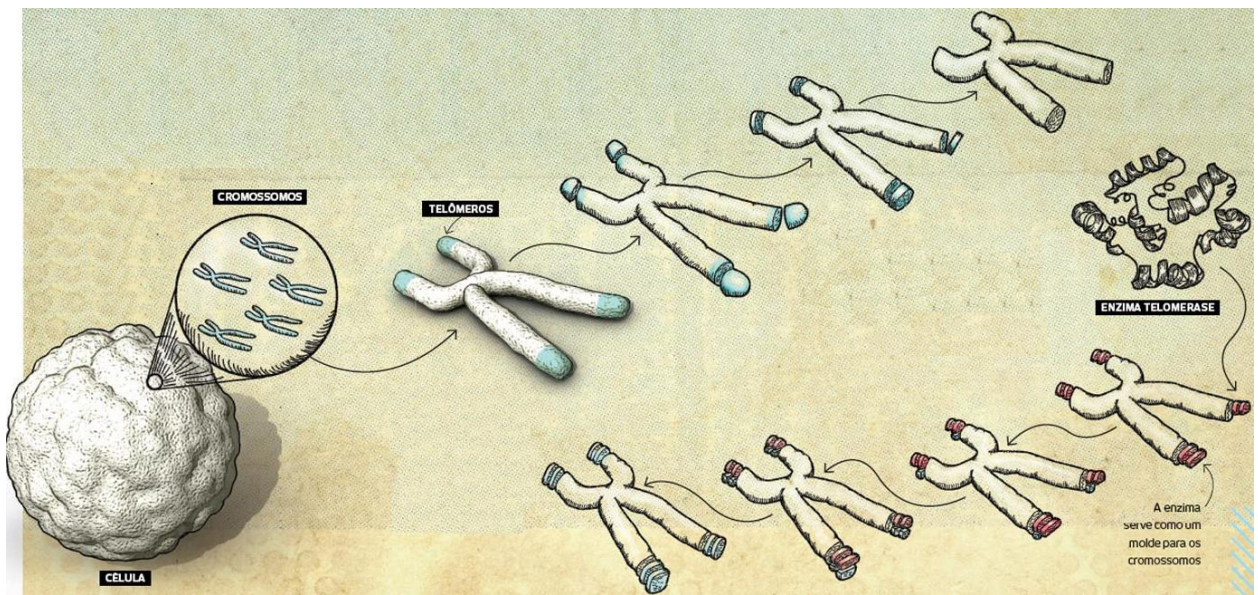


Figura 2 – Esquema representativo da perda do telômero durante a divisão celular e sua recuperação pela enzima telomerase (Fonte: Adaptado de 40)

A expressão do *hTERT* (subunidade catalítica da telomerase humana) é capaz de restaurar o comprimento dos telômeros, evitando o processo de senescência e tornando a célula imortalizada. Esse processo é vital para a manutenção de células replicantes no tumor, já que mantém a integridade dos telômeros e capacita tais células a dividirem-se continuamente (30,31). A imortalização celular permite que os tumores cresçam e dá tempo às células pré-cancerosas ou cancerosas para acumularem mutações adicionais. Na maioria dos casos, se a telomerase for bloqueada nas células

cancerosas, seus telômeros encurtarão de novo sempre que se dividirem, levando a apoptose ou à crise (33). Portanto, a telomerase caracteriza-se como uma enzima chave no processo da carcinogênese, e potencial marcador molecular para prognóstico de diversos tipos de câncer.

A atividade da telomerase é ausente na maioria dos tecidos somáticos humanos normais mas é frequentemente detectável em quase todos os tipos de tumores, reforçando a importância da telomerase no desenvolvimento de câncer (36).

### 1.5 Polimorfismo gênico e prognóstico

Alguns estudos têm ligado o polimorfismo de genes relacionados a telomerase com a susceptibilidade e/ou sobrevivência do câncer de mama (41). O estudo dos polimorfismos dos genes responsáveis pela expressão da telomerase poderá contribuir na determinação do prognóstico, influenciando a susceptibilidade do hospedeiro à progressão tumoral e metástase (32). O trabalho de PELLAT e colaboradores mostrou que vários polimorfismos de nucleotídeo único relacionados com a telomerase tiveram associação com o risco de câncer de mama em geral, incluindo *TERT* rs10069690 e rs2242652 (41).

Os polimorfismos citados acima, porém, não tem, necessariamente, repercussão funcional na atividade da enzima. O polimorfismo *TERT* rs2736100 pode contribuir diretamente para predisposição ao câncer por modificação da função de *TERT* ou por estar fortemente relacionado a desequilíbrios com outras mutações próximas biologicamente plausíveis e causadoras de doenças (30,42), sendo um dos variantes mais comuns do gene *hTERT* associado com o risco de câncer (43). Nesse sentido, o estudo desse polimorfismo se mostra mais promissor.

### 1.6 rs2736100

O polimorfismo *TERT* rs2736100 é localizado no íntron 2 do gene (30), que está localizado no cromossomo 5p15.33 – Figura 3. Shete et al. (44) publicou o primeiro estudo indicando que este polimorfismo pode contribuir para um risco aumentado de glioma. Desde então, vários grupos de pesquisa relataram a associação entre este polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e risco com outros cânceres (36,43,46).

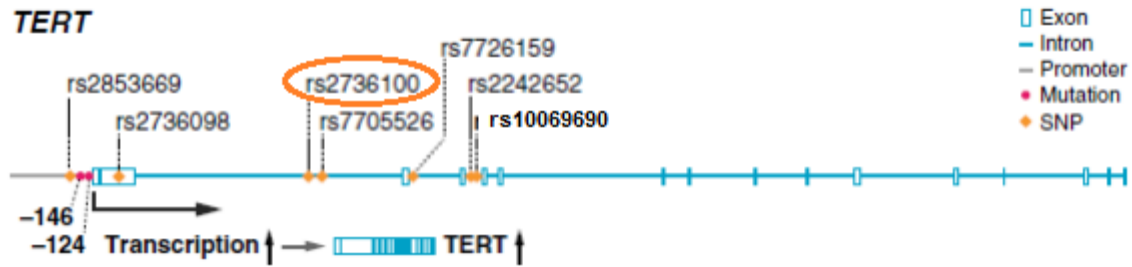


Figura 3 - *TERT* e regiões de polimorfismos (Fonte: Adaptado de 45)

Segundo Choi et al. (43) o polimorfismo *TERT* rs2736100 está associado com telômeros, que foram encurtados em 35 tecidos de câncer gástrico estudados, em comparação com as correspondentes mucosas gástricas não cancerosas. O mesmo autor também relata que o mesmo polimorfismo foi positivamente correlacionado com a expressão da enzima telomerase. Outro estudo relatou que o genótipo *hTERT* rs2736100 GG foi mais frequente nos pacientes com câncer de mama CDI (OR = 5,9; IC 95% = 1,3-28,5;  $p = 0,014$ ) (46).

Uma vantagem do estudo de polimorfismos gênicos é que, por se tratarem estes de características genéticas do indivíduo, e não do tumor, é possível acessar tais informações a qualquer tempo, mesmo antes da doença diagnosticada (nos casos de pacientes com histórico familiar, por exemplo), permitindo a antecipação de condutas. Além disso, a possibilidade de se estudar marcadores usando amostras de sangue periférico ou tecidos de fácil coleta no lugar de fragmentos do tumor traz facilidades adicionais na implementação clínica dessas análises.

Conforme o exposto fica evidente a importância da busca de novos marcadores prognósticos para o câncer de mama. Por ser a telomerase uma enzima importante no processo de carcinogênese, por estar presente na maioria dos tumores e pelos indícios de ser um bom marcador molecular, se faz necessária uma investigação mais profunda no tema, estudando-se inclusive o polimorfismo do gene dessa enzima e verificando a associação deste polimorfismo com variáveis clínicas relevantes.

## 2 Objetivos

**2.1 Objetivo geral:** Analisar o polimorfismo *TERT* rs2736100 em pacientes com câncer de mama e testar a correlação de tais dados com o prognóstico e variáveis clínicas diversas.

### 2.2 Objetivos específicos:

- a) Descrever a população estudada quanto aos aspectos clínicos relevantes;
- b) Identificar o variante mais comum do polimorfismo rs2736100 na população estudada;
- c) Estudar a associação do polimorfismo com características clinicamente úteis na determinação de prognóstico;
- d) Criar um biorrepositório de DNA de pacientes com câncer de mama associado a banco de dados com as informações clínicas para uso e estudos posteriores.

### 3 Metodologia

O trabalho foi conduzido como estudo clínico experimental, em que a população de estudo foi constituída por pacientes com câncer de mama que aceitaram participar da pesquisa, atendidas no período de março de 2015 a setembro de 2016 no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Centro de Câncer de Brasília (CETTRO).

A proposta integra o projeto “Estudo de marcadores moleculares associados à resposta de pacientes oncológicos à quimioterapia para uso em terapêutica racional em saúde pública”, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP/FS-UnB) na área temática “Genética humana” sob número CAAE: 30711114.3.0000.0030 (ANEXO A).

A Figura 4 detalha os parâmetros para estabelecimento da amostra. Os pacientes que aceitaram participar do projeto e não possuíam dados clínicos referentes ao câncer de mama em seus prontuários foram excluídos.



Figura 4 – Critérios de inclusão e exclusão para definição da amostra

#### 3.1 Coleta de sangue

Durante a consulta oncológica o paciente foi convidado a participar do estudo. Aqueles que aceitaram assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B) e receberam um voucher para a coleta de sangue (ANEXO C).

Foi coletado 4 mL de sangue periférico dos pacientes, em tubo com EDTA específico para biologia molecular. A coleta e o armazenamento primário foram realizados pelo Laboratório SABIN/DF, sendo que não houve qualquer custo financeiro para o paciente. Posteriormente o material foi levado para o laboratório da Faculdade de Ceilândia/UnB e processado para extração do DNA.

### **3.2 Extração de DNA**

Foi executada a extração padrão por desidratação e precipitação com uma solução saturada de NaCl, segundo metodologia de Miller, Dykes & Polesky (47). Após extração, o DNA foi diluído em água ultrapura (grau cromatográfico). A concentração e pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop One (Thermo Scientific, Madison, USA). As amostras de DNA foram aliquotadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3 Análise de polimorfismo**

Inicialmente, a abordagem metodológica usada para o estudo do polimorfismo foi a técnica de análise eletroforética de comprimento de fragmentos de restrição após amplificação por PCR convencional. Devido a problemas técnicos, além de uma inesperada modificação na sequência de reconhecimento e clivagem da enzima de restrição (vide resultados), a estratégia foi substituída por sequenciamento de nova geração da região que abrange o polimorfismo rs2736100 no gene *hTERT* humano após amplificação por PCR convencional. As sequências iniciadoras foram: F: 5'-ATG CGA CAG TTC GTG GCT CA-3' e R: 5'-ATC CCC TGG CAC TGG ACG TA-3' (Sigma Aldrich, Canada, 0,025 $\mu\text{mol}$ ).

O procedimento de PCR foi realizada sob condições padrão numa mistura reacional de 30  $\mu\text{l}$ , contendo: 20 nanogramas de DNA extraído; 0,6  $\mu\text{M}$  de cada iniciador; 0,2 mM de desoxirribonucleótidos fosfatados; 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,03U de polimerase Ampli Taq (Uniscience Corporation, Miami, USA, 5U/ $\mu\text{l}$ ); e tampão

adequado (fornecido pelo fabricante). As condições de reação foram as seguintes: 95°C durante 12 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 30s, 58.5°C durante 30s, 72°C durante 30s; e 72°C durante 5 min.

Os fragmentos de DNA, em seguida, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para verificação de tamanho da banda, condição de controle negativo e presença de banda única (Figura 5).

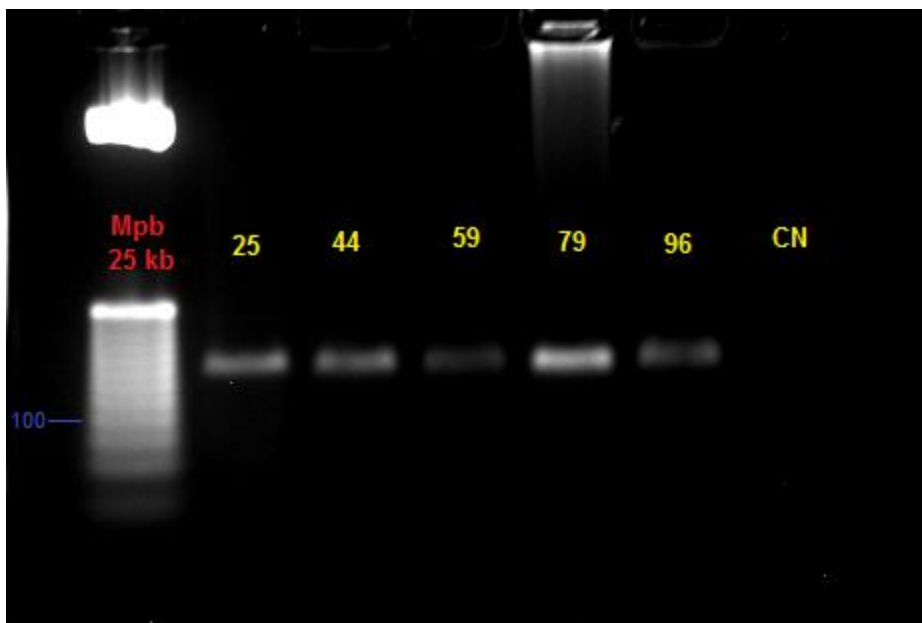


Figura 5 – Gel de agarose a 2% com marcador de 25kb mostrando a banda de 160 pb de 5 amostras de pacientes e controle negativo que foram submetidos a PCR

Para a realização do sequenciamento os produtos de PCR foram novamente quantificados, padronizados para 60 nanogramas e submetidos a um processo de secagem em termobloco a 70°C por 1 hora. As amostras foram enviadas pelos correios ao ACTGene Análises Moleculares Ltda (Alvorada, Rio Grande do Sul), empresa responsável pelo sequenciamento das amostras. O equipamento utilizado pela empresa foi o sequenciador AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram marcados com 2,5 pmol do primer F (rs2736100 - F: 5'-ATG CGA CAG TTC GTG GCT CA-3') e 0,5 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart (Applied Biosystems) com um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador (LGC XP Cycler) nas condições: 96°C durante 3 minutos;

25 ciclos de 96°C durante 10s, 55°C durante 5s e 60°C durante 4m. Depois as amostras foram purificadas (isopropanol 75%), lavadas (etanol 60%), diluídas em formamida Hi-Fi (Applies Biosystems), desnaturadas a 95°C por 5 min, resfriadas em gelo e eletroinjetadas no sequenciador.

Após sequenciamento as sequências e eletroferogramas obtidos foram analisados utilizando o software Chromas Lite (versão 2.01, Technelysium Pty Ltd.) e com a ferramenta PHPH disponível online (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Essas ferramentas foram utilizadas para averiguar a qualidade do sequenciamento e confirmar mutações em regiões de interesse. Os alinhamentos foram realizados utilizando o BLAST (NCBI - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **3.4 Coleta de dados clínicos**

Os dados clínicos foram coletados através dos prontuários eletrônicos dos pacientes disponíveis no HUB e na Cetro e tabelados em planilha no Excel. As variáveis coletadas foram: registro do paciente, ano de nascimento, peso, altura, idade ao diagnóstico de câncer de mama, CID, informações imuno-histoquímicas e anatomo patológico pré-operatórias e da peça do tumor (RH, Ki67, HER2, tamanho do tumor, número de linfonodos acometidos, multifocalidade, estadiamento, classificação histológica, grau e tipo do tumor), cirurgia e situação no momento da última consulta.

### **3.5 Análises Estatísticas**

Para análise descritiva os dados planilhados foram utilizados na construção de tabelas e gráficos que foram qualitativamente analisados.

Para cálculos de probabilidade para inferência, as variáveis foram identificadas e divididas quanto a sua natureza. Os dados das variáveis quantitativas foram analisados quanto à distribuição com testes de normalidade (*D'agostino test*) ou análise de assimetria para grupos com número amostral menor que 20 (admitindo intervalo de normalidade entre -1 e +1). A distribuição dos dados implicou em uso de média ou mediana e, conseqüentemente, testes paramétricos ou não.

As associações foram analisadas por testes de correlação direta numa primeira abordagem, seguida de comparação de grupos compostos por categorização. No caso



das variáveis quantitativas, pontos de corte foram definidos para a composição dos grupos, conforme informado na apresentação dos resultados.

Para análise por categorias, os exames imunohistoquímicos foram categorizados como positivo ou negativo; para RE e RP os valores de 0 e 1 entraram na categoria negativo e >1 na positivo; para o HER2 o valor de 0 foi negativo e +1, +2 e +3 foram positivo. Para o Ki67 retirou-se 20% das amostras centrais a partir da mediana (percentis de 40 a 60), e classificou-se como Ki67 baixo para valores  $\leq$  que o percentil 40 e Ki67 alto para valores  $\geq$  que o percentil 60.

Para o tipo de tumor foi estabelecida três categorias: CID, CLI e outros. Os outros incluíram todos os tipos que não estavam definidos como CDI ou CLI.

Para os linfonodos acometidos estabeleceu-se duas categorias, acometidos para os resultados com  $\geq 1$  linfonodo ou não acometidos para 0 linfonodo.

As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelos testes t ou ANOVA para os dados com distribuição normal e Mann Whitney ou Kruskal-Wallis para dados com distribuição não normal. O teste do  $X^2$  foi empregado para o estudo de associações de variáveis categóricas ou categorizadas.

Para todos os testes estatísticos o valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 7.02 para todas as análises.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Dados clínicos

Ao todo, 119 pacientes com câncer de mama aceitaram participar do estudo, 98 procedentes da Cettro, 12 do mutirão - evento organizado pela Cettro em associação com a Sociedade Brasileira de Cirurgia plástica para atendimento de pacientes que desejavam a reconstrução da mama - e 9 do HUB.

Para a análise clínica 16 pacientes foram eliminados por não haver dados relativos ao câncer de mama no prontuário médico. Para os demais pacientes alguns dados não estavam disponíveis, mas estes permaneceram no estudo e foram analisadas as informações encontradas.

Do total de pacientes, apenas 1 era do gênero masculino (0,84%), o que é esperado pois o câncer de mama é uma doença rara em homens, correspondendo apenas cerca de 0,8 a 1% do total dos casos de câncer de mama (48,49,50).

As informações gerais estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1 – Informações gerais dos pacientes

IMC		Idade ao diagnóstico		Tipo de tumor		
<25	35	<50 anos	50	CDI	CLI	Outros
≥25	60	≥50 anos	53	85	8	5

A OMS classifica como sobrepeso o IMC igual ou superior a 25 (51). 63,15% dos pacientes estão acima do peso (sobrepeso e obesidade), o que pode ser considerado um fator de risco para o câncer de mama. Um estudo mostrou que 1 a cada 8 casos de câncer de mama é atribuído à obesidade (52). Outro estudo, prospectivo com 20 anos de seguimento, encontrou resultados que sugerem que o peso do IMC está associado ao risco de câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas (53). A maior concentração de células adiposas e a baixa massa muscular, presentes na obesidade, podem estar ligadas ao câncer pelas consequências endócrino-metabólicas danosas ao corpo humano (54). Com o excesso de peso há aumento significativo na concentração

de insulina sérica e maior liberação de citocinas inflamatórias, além de conversão periférica aumentada de estrógenos - aumentando assim a proliferação celular e provocando uma resposta imunológica alterada (induz alterações nas células Natural Killers) (53,54). Como todos esses fatores são colaborativos para o surgimento e manutenção de neoplasias é importante conscientizar que o sobrepeso deve ser tratado de maneira cautelosa, pois além de estar relacionado a varias outras doenças está ligado indiretamente ao câncer.

A média de idade no momento do diagnóstico foi de 49,85 anos. Segundo o INCA o câncer de mama é raro antes dos 35 anos e a partir dessa idade a incidência da doença cresce, principalmente após os 50 (48). 19 pacientes do estudo tiveram o câncer diagnosticado na faixa de 28 a 35 anos, sendo que três tinham menos de 30. Na Figura 6 é possível ver a distribuição conforme a faixa etária:

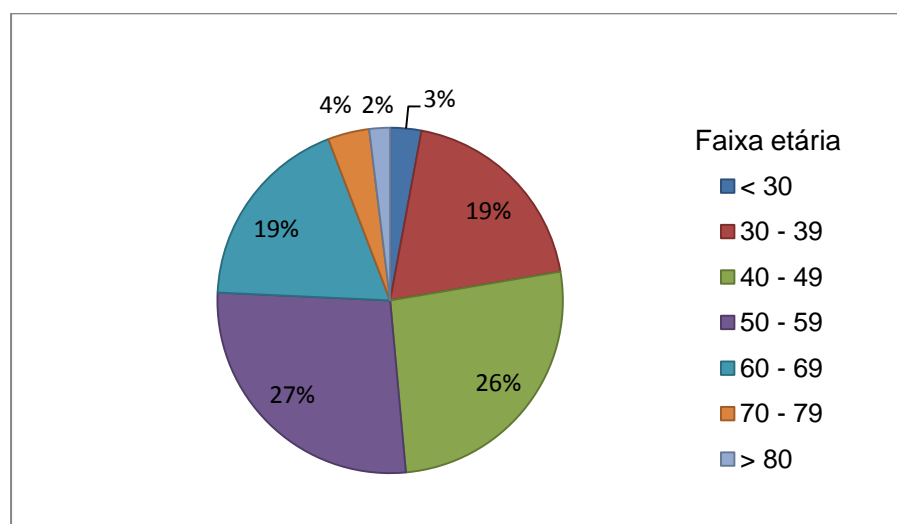


Figura 6 – Porcentagem de casos de câncer de mama de acordo com a faixa etária da idade ao diagnóstico

Atualmente há um esforço do Governo para conscientização da população sobre a doença, que promove campanhas que vão além dos hospitais, através de cartazes, televisão e internet (“outubro rosa”, por exemplo). Este resultado (48% dos casos em pacientes com menos de 50 anos) pode ser o reflexo dessas campanhas, onde as pessoas ficam mais atentas aos sinais e sintomas suspeitos e procuram os serviços de saúde para confirmação do diagnóstico. Assim, parte da população acaba

diagnosticando mais precocemente o câncer de mama – que pode resultar num melhor prognóstico e menor morbidade associada ao tratamento (55).

Sobre os tipos de tumores, o mais comum foi o CDI, dado que está de acordo com a literatura (16,56). Os tipos menos frequentes, com um ou dois casos (ou não totalmente classificados), foram: carcinoma intraductal não infiltrante SOE, carcinoma micropapilífero invasivo da mama, carcinoma medular e carcinoma mamário invasivo. Estes possuem uma frequência de 1%, sendo o micropapilífero uma forma rara de carcinoma invasivo (28). O CLI representa 8,16% da amostra, conferindo uma frequência conforme a literatura, que relata uma faixa entre 2 a 15% (28). Em geral o CDI e CLI apresentam prognósticos semelhantes, com sobrevida global de 85% em 5 anos (56).

Dos 103 pacientes, 17 continham o relato de recidiva e a informação sobre o grau do tumor estava disponível em 82 casos (Tabela 2).

Tabela 2 – Grau do tumor e casos de recidiva

Grau	casos	recidiva	
		casos	%
1	11	1	9,09
2	40	4	10
3	31	6	19,35

O caso da recidiva do tumor de Grau 1 ocorreu depois de 10 anos. Os casos de recidiva do Grau 2 apresentaram metástase depois de 2 a 10 anos e os de Grau 3 depois de 2 a 7 anos.

No grau histológico o aspecto morfológico do tumor correlaciona-se com o seu grau de malignidade. Os parâmetros avaliados incluem o grau de formação de túbulos/glândulas, a atipia nuclear/pleomorfismo e o índice mitótico. É considerado um excelente fator prognóstico, sendo que a sobrevivência piora progressivamente à medida que o grau histológico aumenta. Nos de Grau 1, classificados como tumores bem diferenciados, quadros de recorrência e metástase são raros. Os de Grau 2 são os classificados como moderadamente diferenciados. Já os de Grau 3, pouco

diferenciados, apresentam alto risco de recorrência e metástases precoces (28,57). Os resultados, apesar de uma certa diferença com o achado na literatura (acima), mostram uma menor sobrevida livre da doença conforme o maior grau do tumor. Um estudo mais detalhado, com dados mais completos, deve ser feito para avaliar a real relação da recidiva com o grau do tumor, já que essa pode ter o risco aumentado dependendo de outros fatores, como o tipo de tratamento utilizado na primeira ocorrência do câncer.

Quanto ao tamanho, 69 amostras foram medidas na peça do tumor coletada em cirurgia e 3 por biópsia de agulha. 70,27% dos casos apresentaram tamanho menor que 3 cm (Figura 7).

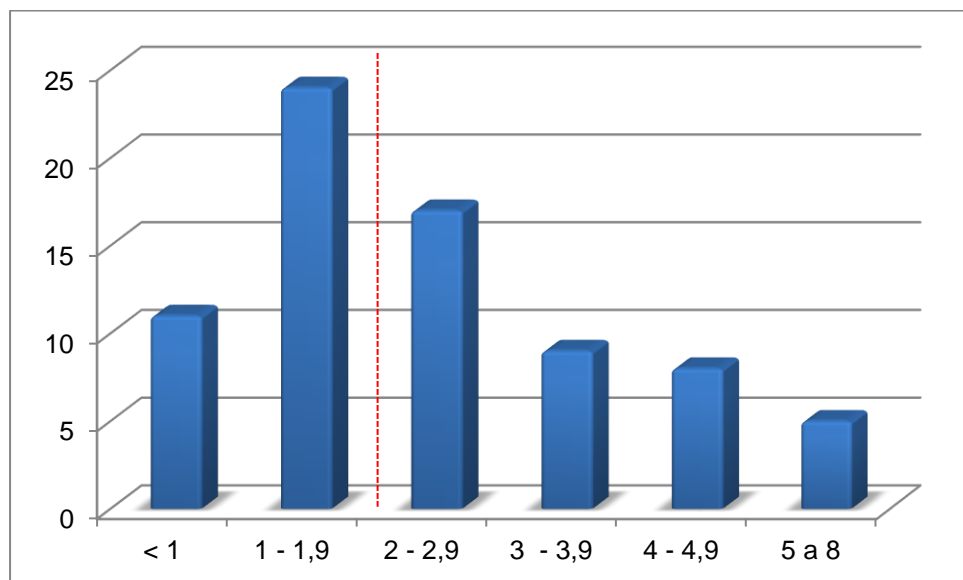


Figura 7 – Tamanho do tumor separado por faixas, em cm. A altura da barra indica número de casos e a linha pontilhada vermelha separa os casos mais graves (à direita) dos mais leves (à esquerda)

O tamanho do tumor é um fator determinante para o prognóstico do paciente (25). Para os pacientes com tumores menores que 2 cm há indicação de uma sobrevida em 20 anos de 88%. Os tumores de menor tamanho estão relacionados a um melhor prognóstico tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre da doença (56). A maioria dos casos tiveram algum tratamento quimioterápico antes da cirurgia, o que pode estar relacionado a 70,27% dos casos apresentarem um tumor menor que 3 cm. Entretanto, neste trabalho as informações sobre a quimioterapia não foram coletadas, o que impossibilita a análise mais profunda desta relação. Sobre o estadiamento primário,

de 40 casos onde o TNM foi descrito, 15% apresentou T1, 47,5% T2, 25% T3 e 12,5% T4. Desses, 10 mantiveram o estadiamento inicial, 10 apresentaram redução na classificação do estadiamento T após a biópsia da cirurgia e 3 tiveram a classificação aumentada. Como o estadiamento inicial é realizado na maioria dos casos por um olhar clínico (exame físico) ou mamografia, a concordância com o resultado da biópsia nem sempre está presente, até porque alguns casos são submetidos a tratamento antes da cirurgia, que quase sempre resulta na redução do tamanho do tumor.

Sessenta e três pacientes tiveram a imunohistoquímica pré-cirúrgica realizada (Tabela 3). Para os exames imunohistoquímicos em que havia apenas o resultado de positivo considerou-se a moda (resultado mais frequente). Para o RE houve 7 casos de resultado apenas positivo e a moda utilizada foi de 90. Para o RP houve 6 casos e a moda utilizada foi de 90. Para o Ki67 os percentis de 40 e 60 corresponderam aos valores entre 20 e 30, respectivamente, e classificou-se como Ki67 baixo para valores  $\leq 20$  e Ki67 alto para valores  $\geq 30$ .

Tabela 3 – Casos de imunohistoquímica pré-operatória

	Positivo	Negativo
RE	44	19
RP	38	25
HER2	19	44

Através dos dados do prontuário, 6 estavam classificados como luminal A, 8 como luminal B, 12 como triplo-negativo e 1 como HER2 impuro. Na imunohistoquímica do câncer de mama é comum a expressão positiva dos recptores hormonais (RE e RP) em aproximadamente dois terços dos casos e de até 20% para amplificação do HER2 (27). Os tumores luminais têm sido associados a prognósticos mais favoráveis enquanto os subtipos triplo-negativo e superexpressão de HER2 a prognósticos mais reservados (34,57). Uma das implicações do prognóstico mais favorável é por conta do tratamento alvo-específico, com definição do emprego de drogas como o trastuzumabe, naquelas pacientes que apresentam expressão do HER2, ou dos antagonistas dos RE ou de RP, naquelas pacientes cujos tumores expressam esses receptores hormonais

(34). Os tumores triplo-negativos, por não expressar nenhum desses receptores, ainda carecem de tratamentos específicos, apresentando portanto um perfil mais agressivo e consequentemente com maior risco de recorrência e probabilidade de morte decorrente da doença de 17% em 10 anos, quando comparados aos outros subgrupos (27,34,57). Com isso, concluímos que o resultado imunohistoquímico para o câncer de mama é determinante na escolha de um esquema terapêutico adequado e proporciona um prognóstico tumoral mais criterioso, com uma melhor e maior sobrevida ao paciente com câncer (25).

Analisando ainda a imunohistoquímica antes da cirurgia, é importante relatar que para alguns casos houve registro da imunohistoquímica pós-cirurgia. Comparando as duas, nos 16 casos apenas 3 foram concordantes com o resultado pré-cirúrgico. Dos 13 casos que apresentaram diferença, os erros foram (Figura 8):

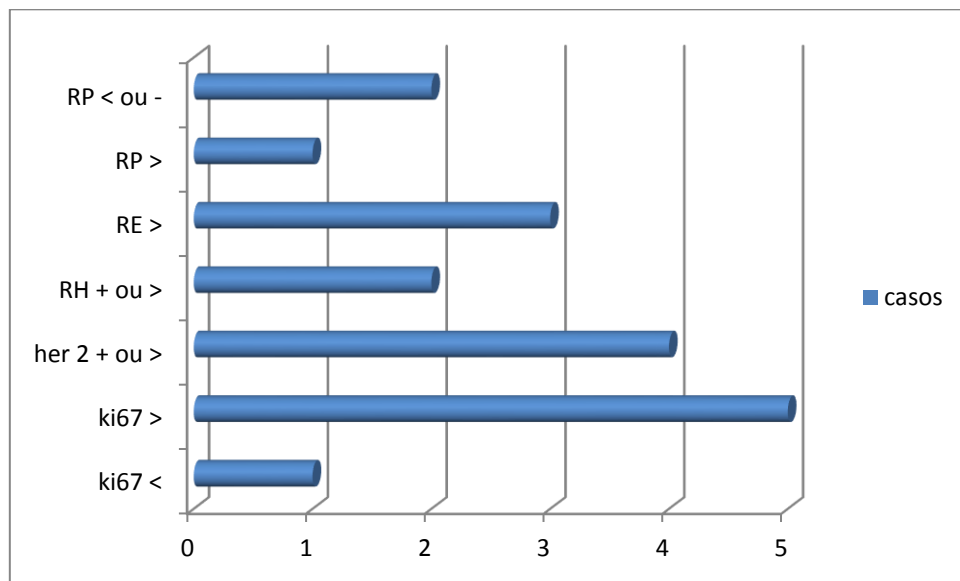


Figura 8 – Itens da imunohistoquímica pós-cirúrgica não-concordante com biópsia pré-cirúrgica. Os resultados são da biópsia da peça do tumor comparados aos resultados da biópsia por agulha.

Este resultado poderia ter influência de tratamento antes da cirurgia se os resultados pós-cirurgia fossem no geral menores que os da pré-cirurgia, o que aconteceu em apenas 3 casos (RP menor e negativo e Ki67 menor). O aumento desses valores pode significar baixa sensibilidade da biópsia com agulha (pré-cirúrgica) ou

progressão do tumor. Ough, Velasco & Hieken (58) realizaram um estudo com 203 pacientes e mostraram que em 86% dos casos houve correspondência imunohistoquímica exata nas duas amostras (biópsia por agulha e cirúrgica) e comparou a outros estudos que também tinham os mesmos resultados. Um estudo recente, com 171 pacientes, mostrou que 17,5% dos pacientes tiveram a classificação final alterada pelo resultado da biópsia cirúrgica, em relação a classificação inicial feita pela biópsia por agulha (59). Como os dados dos pacientes do estudo não estavam completos, apenas foi encontrado um caso onde estava relatada a classificação final alterada após a biópsia cirúrgica, onde inicialmente foi classificado como Luminal A e após para Luminal B. Apesar dessa não concordância pós-cirúrgica representar somente 12,62% dos casos, este dado é relevante porque está associado a maior probabilidade a ter fatores de mau prognóstico, como maior tamanho do tumor, RP negativo, grau III e idade mais jovem no momento do diagnóstico (59).

A biópsia por agulha é um dos pontos fortes no tratamento inicial do câncer de mama, pois facilita a escolha do tratamento mais adequado, reduzindo custos (58). O problema desse exame para o diagnóstico geral do paciente está relacionado a dois pontos:

- 1- A amostra da biópsia de agulha = a quantidade de células tumorais observadas em espécimes de biópsia de agulha é menor do que a disponibilizada em espécimes ressecados cirurgicamente; e a amostra de tecido obtida no processo é geralmente da zona central da massa tumoral, porém as áreas periféricas do tumor são biologicamente mais ativas e altamente proliferativo (59).
- 2- A decisão por não fazer a biópsia cirúrgica = por medida de redução de custos, por vezes a biópsia cirúrgica não é realizada por conta da obtenção prévia do resultado imunohistoquímico pela biópsia de agulha; portanto o tratamento adjuvante pós-operatório continuará levando em conta os dados iniciais do tumor (58).

Mesmo assim a biópsia pré-cirúrgica continua a ser indicada, apenas precisam melhorar a técnica na questão da sensibilidade e garantir a biópsia pós-cirúrgica para conferir o estado do tumor e organizar as medidas de tratamento pós-cirurgia de maneira mais adequada.



Voltando a Figura 8, o Ki67 foi o marcador mais alterado. A relevância da alteração desse marcador está relacionada à categorização dos tumores luminais e consequentemente do tratamento aplicado (59), já que inicialmente pode ser classificado com um tumor de melhor prognóstico e posteriormente obter um quadro pior que o primeiro. A prática de avaliar o marcador na peça cirúrgica pode minimizar os erros. Quanto a alteração, a elevação dos níveis de Ki67 na biópsia cirúrgica comparado a biópsia pré-operatória já foi relatada em outros estudos (58,59) e os níveis extremamente discordantes do marcador pode estar associado à agressividade do tumor.

De 103 pacientes, 93 tiveram registro de cirurgia (Figura 9). A categoria Outros inclui ressecção segmentar, centralectomia e esvaziamento axilar. Pelo menos um método cirúrgico foi aplicado na maioria dos pacientes. O aumento da quantidade de cirurgias pode ser explicado pelo avanço no rastreamento do tumor, através de mamografias, exames de estadiamento e imunohistoquímicos (55).

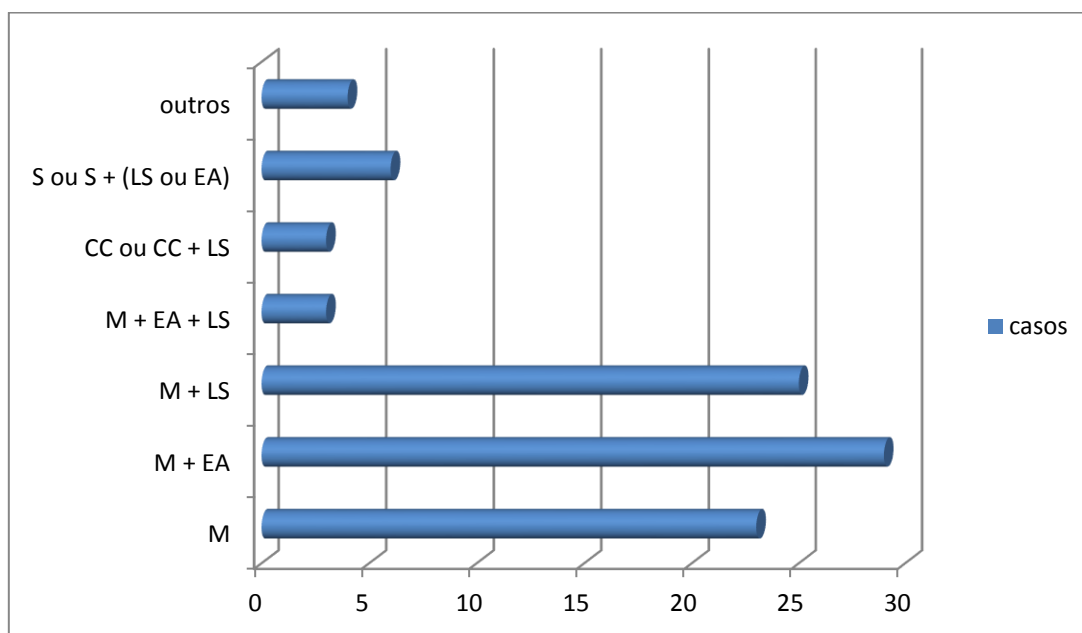


Figura 9 – Tipos de cirurgias e casos registrados. Legenda: S – setorectomia; EA – esvaziamento axilar; LS – linfonodo sentinela; CC – cirurgia conservadora; M – mastectomia

A mastectomia foi o tipo de cirurgia mais comum, realizada em 80 pacientes. Os subtipos inclui simples, radical, bilateral, parcial, radical e radical modificada.

Abreu & Koifman (56) relataram que as cirurgias radicais (mastectomias) estavam sendo substituídas gradativamente em favor das cirurgias conservadoras (segmentectomias) (60) o que não está em concordância com este resultado (80 versus 5). A mastectomia, por ser uma cirurgia que retira boa parte da mama, promove um maior impacto negativo para as mulheres, em comparação com as cirurgias conservadoras, principalmente devido às alterações emocionais, na imagem corporal e a incapacidade funcional relacionada (10,60) e também está associada a outras complicações raras de longo prazo, mas potencialmente fatais (55). Como a mastectomia é uma cirurgia mais agressiva, é importante rever o prognóstico com cautela para utilizá-la somente nos casos mais graves e proporcionar o cuidado emocional a estes pacientes.

A biópsia do linfonodo sentinela foi realizada em 35,48% dos casos e o esvaziamento axilar em 37,63%. A cirurgia comumente é acompanhada da retirada dos linfonodos axilares ou esvaziamento axilar, procedimento importante no estadiamento e controle locorregional do câncer. Nos últimos anos, o esvaziamento axilar está sendo substituído pela biópsia do linfonodo sentinela (o primeiro linfonodo que recebe a drenagem de linfa do tumor). O benefício desta prática confere taxas de recorrência locorregional em oito anos semelhantes às do esvaziamento axilar, mas com um melhor custo-efetividade em 20 anos (55).

O tipo de tumor foi associado à classificação final (imunohistoquímica da biópsia por agulha) – Figura 10.

O CDI apresentou associação com os subtipos de pior prognóstico (Quadro 3 (12,22,23)), dando assim a possível característica de um tumor mais agressivo. Já o CLI estava presente apenas no subtipo Luminal A, que apresenta melhor prognóstico se comparado aos outros subtipos (Quadro 3 (12,22,23)), por isso este tipo de tumor pode apresentar um quadro menos agressivo. O estudo de Peruzzi & Andrade (26), com 94 casos, não encontrou associação entre essas variáveis ( $p= 0,118$ ), diferentemente do encontrado neste estudo. Zuccari et al. (25) cita a associação da amplificação do HER2 à ocorrência do CDI e a um prognóstico ruim. Analisando isso, a associação encontrada faz mais sentido, considerando que o HER2 está relacionado a um prognóstico mais reservado (34,57) e pode estar amplificado no luminal B, presente

no HER2 impuro e ausente no luminal A. No caso do triplo negativo, ao se associar com o CDI, o pior prognóstico está justificado pela ausência dos receptores no tumor, que implica num tratamento menos específico (Quadro 3 (12,22,23)). O carcinoma mamário invasivo não foi bem especificado no prontuário, em relação ao tipo de tumor, mas, pelos resultados encontrado, possivelmente trata-se de um CDI.

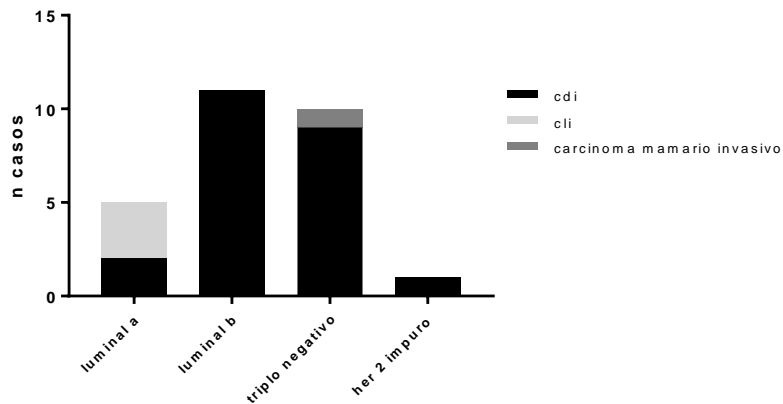


Figura 10 – Tipo de tumor associado a classificação histológica ( $p= 0,0116$ ,  $n=27$  e teste do  $X^2$ )

Analisando a idade ao diagnóstico com outras variáveis, apenas houve correlação com a altura ( $p= 0,0137$ ,  $n=94$  e teste de correlação de Spearman). Deve-se considerar que o valor clínico desta informação pode não ser de real significância para a clínica/prognóstico. Entretanto não se pode ignorar a associação. Alguns estudos mostraram que mulheres mais altas parecem ter risco elevado de câncer de mama (60). A puberdade é caracterizada por mitose celular intensa e crescimento de tecidos, com aumentos na altura e peso e o desenvolvimento inclusive de tecido mamário - influência dos esteroides sexuais como mediadores de crescimento. Para pessoas mais altas esse processo é maior e poder ser um fator de risco para o câncer da mama (60,61). Apesar da falta de estudos e mecanismos mais claros, há evidências de que a altura adulta é um fator de risco para o câncer de mama em mulheres e que a associação entre a altura adulta e o risco de câncer de mama provavelmente será causal (61). Portanto, o câncer poderá ser manifestado mais cedo em mulheres mais altas, o que

justificaria a correlação inversamente proporcional entre idade ao diagnóstico e altura encontrada nesse estudo ( $R = -0,2536$ ).

Outra correlação com a altura que foi significativa foi com o Ki67 – Figura 11.

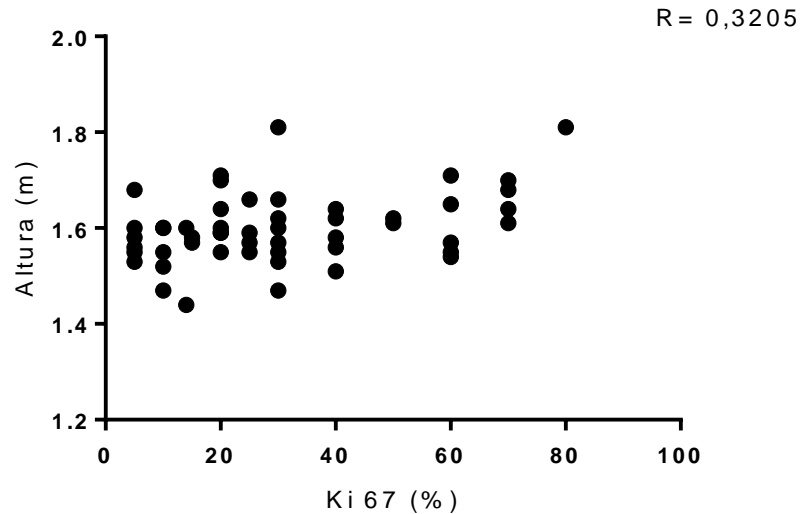


Figura 11 – Associação entre Ki67 e altura ( $p=0,0193$ ,  $n= 53$ , intervalo de confiança de 95% para valor de  $R = 0,04681$  a  $0,5494$  e teste de correlação de Spearman)

Já foi comentada a associação da maior altura ao risco de câncer (60,61). A altura também está ligada a hormônios de crescimento, fatores nutricionais, fatores de crescimento semelhantes à insulina e proteínas de ligação a hormônios sexuais. Estes hormônios influenciam a maturação sexual, incluindo a idade da puberdade e o armazenamento de gordura, influenciando os níveis de estrogênios, que, por sua vez, induzem a proliferação celular (62). O início do ciclo celular é controlado por estes fatores através da ligação com receptores específicos, os quais, quando ativados, emitem um sinal de transdução do citoplasma ao núcleo celular provocando a proliferação celular (63). Como o Ki67 é um indicador do número de células presentes no ciclo celular e no indivíduo com maior altura os fatores que estimulam a proliferação celular estão quantidades mais elevadas, os dois estão associados indiretamente, pois os fatores relacionados a maior altura acabam elevando os níveis de Ki67. Estes dados são concordantes com o resultado, que apontam uma correlação diretamente proporcional. Para o câncer esta associação é maléfica pois a proliferação de células

neoplásicas será mais expressiva, piorando o prognóstico do paciente. Por fim, deve-se considerar que a associação encontrada pode ser secundária, sendo a altura, na realidade, mero reflexo de outra característica não estudada, resultando em confusão de efeito.

A expressão de Ki67 também apresentou associação com o tipo de tumor e grau do tumor – Figura 12 e Figura 13, respectivamente.

Apesar de não haver relatos claros na literatura sobre o pior prognóstico em relação ao CDI e CLI, os resultados deste trabalho mostram uma associação do CDI aos indicadores de pior prognóstico. Na Figura 12 é possível ver que os pacientes com Ki67 alto não apresentaram o tipo de tumor CLI e no CDI a quantidade de casos com o Ki67 alto foi maior que os casos com Ki67 baixo, mostrando a associação do CDI ao Ki67 alto. Entretanto, a ocorrência de CLI neste estudo teve um n pequeno (n=8) e os casos estudados foram reduzidos por falta de dados em alguns. Para uma associação mais confiável do tipo de tumor e pior prognóstico, um estudo com mais pacientes com o tipo de tumor CLI deve ser feito.

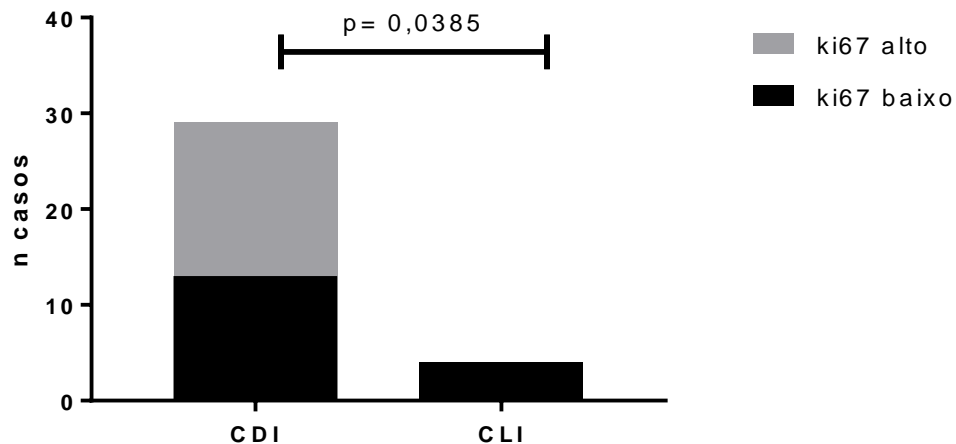


Figura 12 – Tipo de tumor associado a Ki67 alto e baixo (n= 33 e teste do  $\chi^2$ )

O maior grau do tumor (Grau 3) foi associado ao Ki67 alto (Figura 13) e apenas um caso com Ki67 baixo foi presente. Para colaborar mais com esta associação, ao se reduzir o grau do tumor a quantidade de casos com Ki67 alto também diminui. Já a associação do Ki67 baixo com o grau do tumor não mostrou essa correlação



A Figura 14 mostra que no grupo com Ki67 alto a ocorrência de linfonodos acometidos é maior. No grupo de Ki67 baixo apenas três casos apresentaram linfonodos acometidos. O número de linfonodos acometidos é uma das informações prognósticas de maior valor e inúmeros estudos demonstram que a sobrevida do paciente está diretamente ligada a este comprometimento. Pacientes que apresentam linfonodos não acometidos possuem um melhor prognóstico tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre da doença, e acima de 77% em 10 anos de sobrevida global (56). Kim et al.(59) correlacionou as duas variáveis e não encontrou significância ( $p=0,625$ ) e em outros estudos não foi encontrada essa associação. Neste estudo a associação só apresentou significância ao se categorizar Ki67 em alto e baixo. Considerando que ambas as variáveis podem estar relacionadas a pior prognóstico (de acordo com a quantidade de linfonodos acometidos e Ki67 alto), é de se esperar uma associação. O Ki67 por estimular a proliferação celular pode induzir o tumor a crescer para além das mamas, fazendo que as células cancerígenas alcancem o linfonodo. Mas para afirmar a importância clínica dessa associação estudos mais específicos devem ser realizados.

Os resultados deste trabalho confirmam o uso do Ki67 como fator prognóstico, mostrando que níveis aumentados estão relacionados a tumores mais agressivos.

Os receptores hormonais também apresentaram associação entre eles e com outras variáveis – Figura 15 e 16.

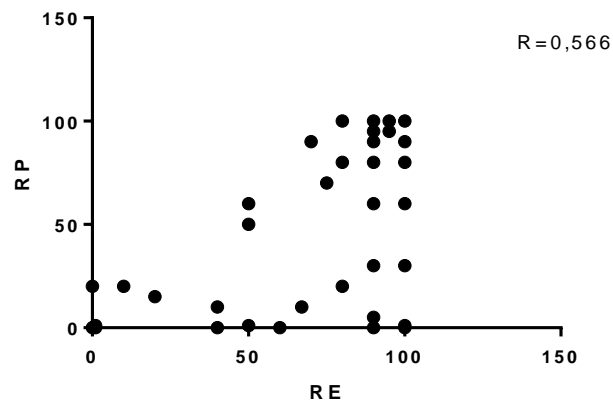


Figura 15 – Correlação entre os valores de RE e RP ( $p= <0,0001$ ,  $n= 58$ , intervalo de confiança de 95% foi de 0,3535 a 0,7229 e o teste de correlação de Spearman)

Houve correlação significativa entre RE e RP. A associação continua mesmo excluindo casos em que se utilizou os valores de moda para RE e RP (7 e 6 casos, respectivamente, com valores de 90).

A associação demonstrada nas Figuras 15 e 16 são esperadas, já que a maioria dos tumores positivos para RP são também positivos para RE (27). A associação entre o RE e RP por categorias (positivo e negativo) também obteve significância.

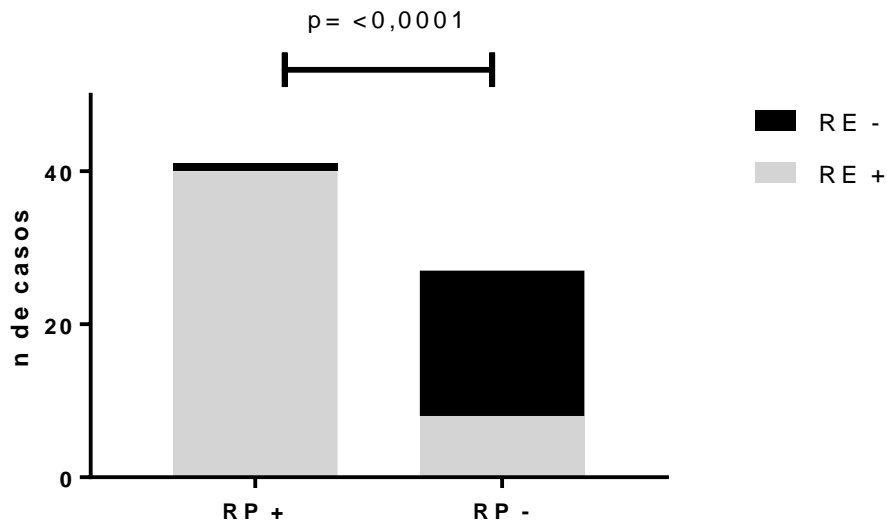


Figura 16 – Associação entre RE e RP positivos e negativos (n = 68 casos e teste do  $\chi^2$ )

Houve apenas um caso em que o tumor apresentou RE negativo e RP positivo. Já para os casos de RE positivo em tumores com RP negativo houve uma diferença maior (8 casos) mas pode ser explicado pela distribuição mais homogênea do RE nos cânceres de mama (58). Esta associação do tumor com RP positivo apresentar RE também positivo é um fator de bom prognóstico (27,56).

Ao separar os receptores hormonais em positivo e negativo, tanto o receptor de estrogênio quanto o de progesterona mostraram associação positiva com o grau do tumor – Figura 17 e 18.

Nas duas associações, o grau do tumor foi aumentando ao se aumentar os casos de ausência dos receptores (RE e RP negativos). O RE negativo está correlacionado com a baixa diferenciação tumoral (56), que é concordante com o resultado encontrado.



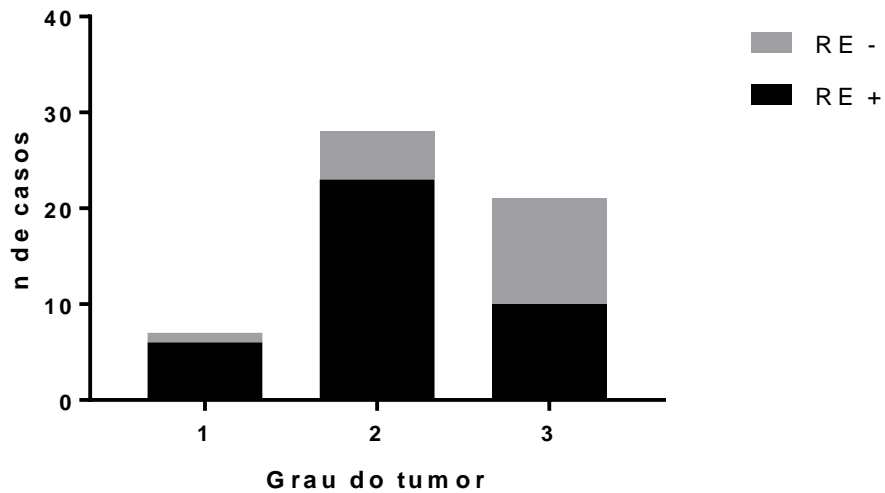


Figura 17 – Grau do tumor associado a RE positivo e negativo ( $p=0,0208$ ,  $n=56$  casos e do  $\chi^2$ )

No tumor de grau 2 ambos os receptores positivos apresentaram a maior quantidade de casos. Não foi encontrada associação deste tipo na literatura. Alguns estudos mostraram uma associação significativa entre tumores com receptores hormonais positivos e baixo grau histológico (27), o que não foi tão concordante, já que a quantidade de casos com receptores positivos foram maiores tanto no de grau 2 quanto no de grau 3, se comparado ao grau 1. Como o diagnóstico do câncer de mama é influenciado por diversos fatores, algum outro fator pode estar influenciando esses casos onde o RP e RE positivos ocorreram mais nos tumores de maior grau.

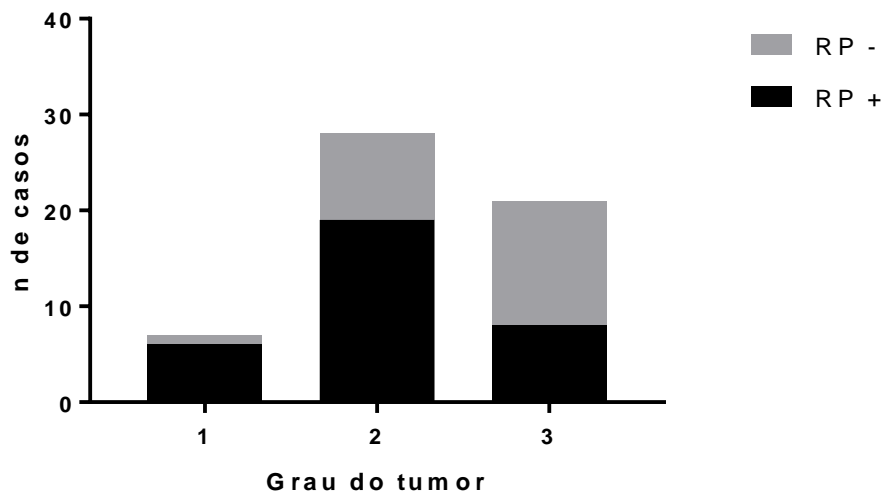


Figura 18 – Grau do tumor associado a RP positivo e negativo ( $p=0,0340$ ,  $n=56$  casos e teste do  $\chi^2$ )

O receptor de estrogênio apresentou associação com a variável multifocalidade do tumor – Figura 19.

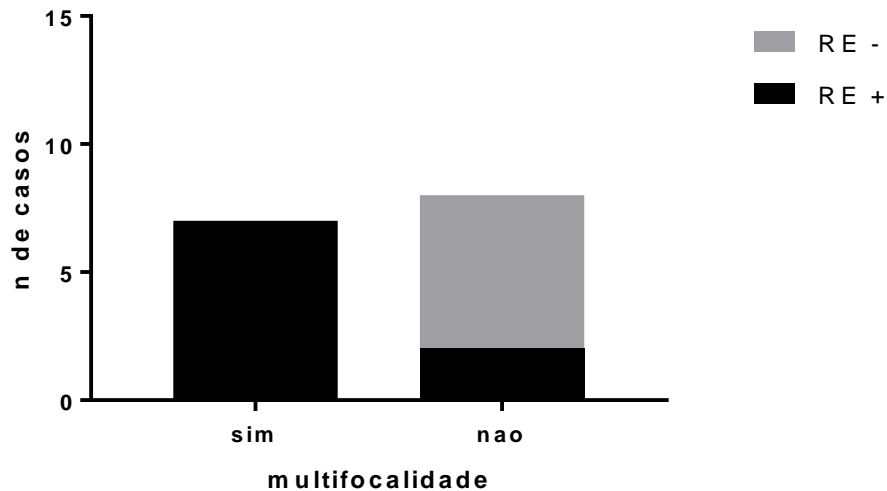


Figura 19 – Multifocalidade associada a RE positivo ou negativo ( $p=0,0070$ ,  $n=15$  e Teste de Fisher)

O RE positivo está relacionado a tumores de melhor prognóstico (27), e quando negativo está correlacionado a diversas características desfavoráveis ao diagnóstico (56). Considerando que a multifocalidade consiste na presença de focos microscópicos do carcinoma e embolias linfáticas ou vasculares (28), o resultado não foi concordante com a literatura, já que os receptores positivos ocorreram mais nos tumores que apresentaram multifocalidade e apresentaram poucos casos positivos nos que não eram multifocais (Figura 19).

O RP mostrou associação com o IMC normal ou sobrepeso (Figura 20). Já foi comentada a associação do câncer de mama ao sobrepeso, pelas consequências endócrino-metabólicas danosas ao corpo humano. Por esses motivos, indiretamente os RP podem estar em maior quantidade nos pacientes que estão acima do peso. Nesta associação o grupo com IMC abaixo do valor de sobrepeso apresentou quantidades parecidas de casos para RP positivo e negativo. Já o IMC elevado mostrou maior associação com o receptor de progesterona positivo.

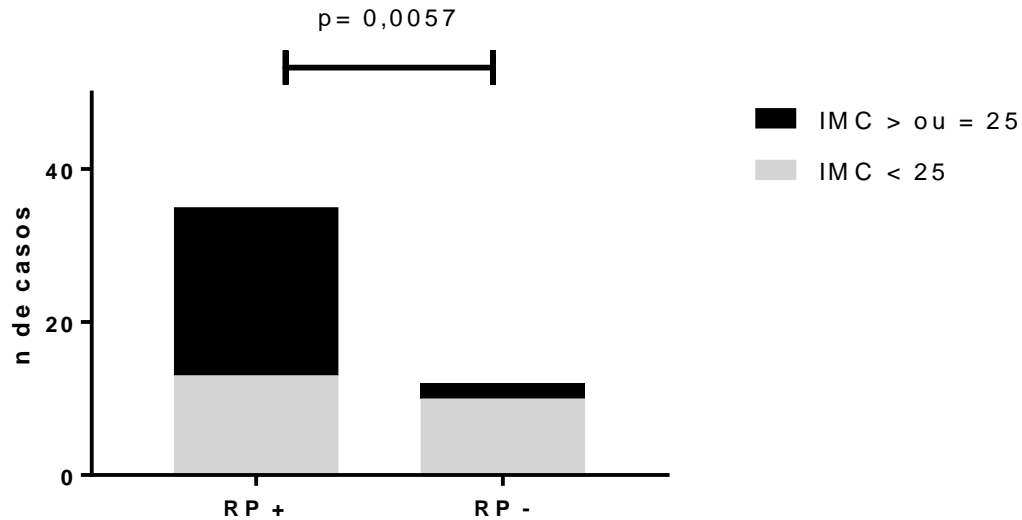


Figura 20 - Associação entre IMC e RP positivo ou negativo (n=47 e teste do  $\chi^2$ )

O sobrepeso também foi associado ao tamanho do tumor pelo estadiamento – Figura 21. Sabe-se que quanto maior o estadiamento T, maior o tumor e menor a sobrevida (31). Aqui podemos observar que o número de casos com estadiamentos de pior prognóstico foi maior para aqueles que tinham o IMC maior que 25. Essa associação é esperada pelo fato do sobrepeso estar ligado ao aumento de liberação de fatores que estimulam o crescimento tumoral (52,54).

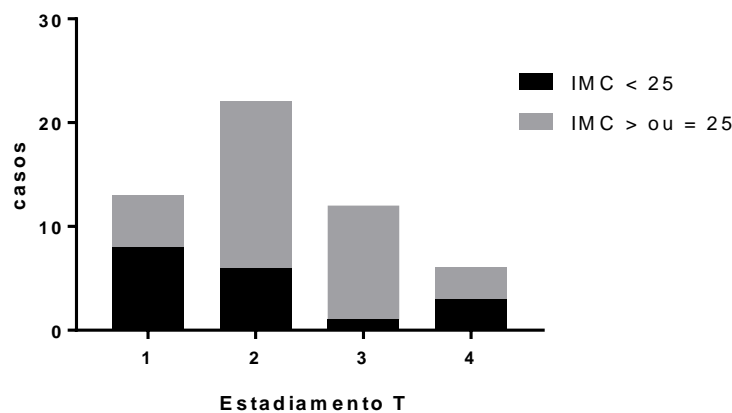


Figura 21 – Associação entre IMC e estadiamento T do tumor ( $p= 0,0286$ ,  $n= 53$  e teste do  $\chi^2$ )

Outra associação significativa encontrada foi entre o tamanho e grau do tumor – Figura 22. Observa-se que tumores maiores apresentam grau maior. Ambas as

variáveis separadas apresentam um prognóstico pior para valores elevados (25,57) e a associação delas confere um prognóstico mais severo. O pós teste de Dunn's mostrou diferença entre os grupos 1 e 3, com valor de  $p=0,048$ .

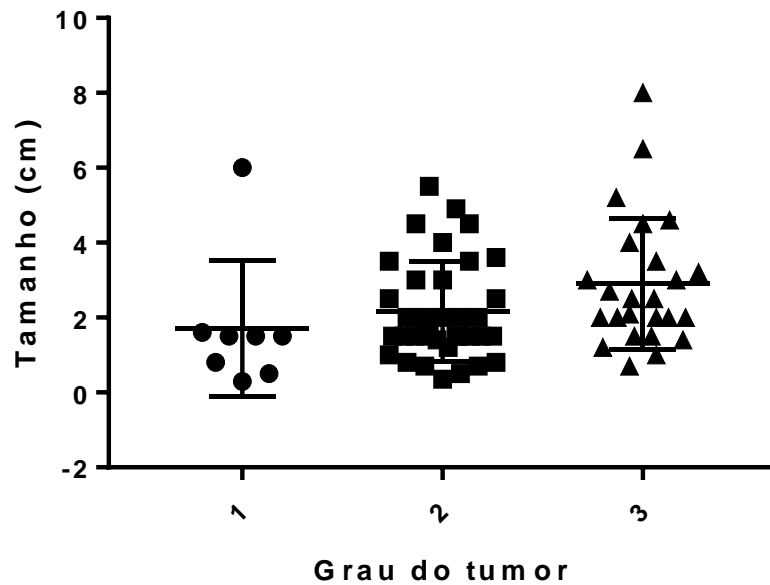


Figura 22 – Associação do tamanho do tumor em cm com o Grau do tumor ( $p=0,0330$ ,  $n=69$  casos e teste Kruskal-Wallis)

Enquanto novos marcadores para o câncer de mama não são descobertos, a utilização dos marcadores existentes já colabora para o avanço no diagnóstico e tratamento do câncer. Este trabalho encontrou associação em diversas características gerais do paciente (altura, idade e IMC) e características do tumor (RE, RP, Ki67), reafirmando a importância deles na clínica para a definição do melhor e mais fidedigno prognóstico.

#### 4.2 Polimorfismo

Através do sequenciamento foi identificada a região do polimorfismo rs2736100 da *hTERT* e após exclusão das amostras que não atenderam aos critérios de análise de qualidade da sequência foram aproveitados os dados de 63 das 96 amostras sequenciadas (Tabela 4). 33,33% dos pacientes apresentaram genótipo GG e o

genótipo AG foi o mais frequente nos pacientes (55,56%). Adicionalmente, foi encontrada uma possível deleção em 11,11% da população estudada – Figura 23. Esta deleção é justamente da base variável no polimorfismo, e ainda não foi relatada na literatura.

Tabela 4 – Genótipos do polimorfismo rs2736100 e quantidade de casos

Genótipo	casos
AG	35
GG	21
deleção	7

Na Tabela 5 é possível ver a quantidade de casos e frequência por distribuição alélica. O alelo G apresentou frequência de 61,11%. Um estudo na população americana dos EUA com câncer de mama encontrou frequência de 41,02% para o alelo G (41). Outro estudo, também em pacientes com câncer de mama mas com etnia turca, definiu a frequência do alelo G como 59,81% (46). Embora a frequência do alelo G na população do nosso estudo foi um pouco maior, ela apresentou semelhança com os resultados encontrados na literatura.

Tabela 5 – Casos e frequência alélica para o polimorfismo rs2736100

Alelo	Casos	Frequência
A	35	0,27 ou 27%
G	77	0,6111 ou 61,11%
deleção	14	-
Total	126	

O estudo de Choi et al (43), realizado em população coreana, obteve frequência de 36% para o alelo A e verificou que o mesmo está intimamente associado com o comprimento encurtado dos telômeros e a expressão reduzida do mRNA de *hTERT* no cancro gástrico. Nossa frequência para o alelo A foi um pouco menor e demais análises comparativas não foram realizadas.

Devido a falhas na técnica, o sequenciamento na região do polimorfismo não ficou muito legível para alguns casos. Os casos parecidos com o da Figura 23 foram definidos para este estudo como deleção – 7 casos.

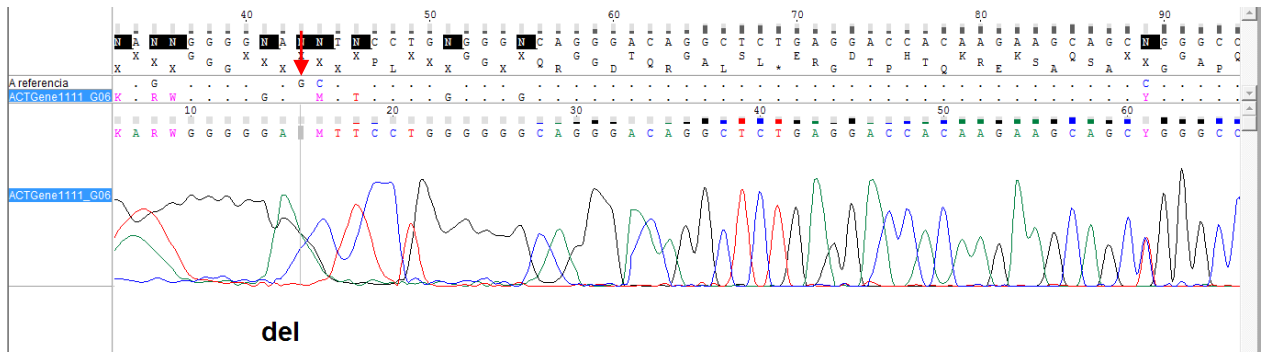


Figura 23 – Eletroferograma do sequenciamento de uma amostra com possível deleção para o polimorfismo rs2736100 da *hTERT*

A ocorrência da deleção é uma descoberta relevante. As substituições de nucleotídeos e deleções constituem 85% das mutações responsáveis por doenças hereditárias em humanos. Estas anormalidades moleculares podem residir não apenas nas regiões de codificação de genes, mas também em regiões não-codificantes a promotores, e as suas consequências são variadas (64).

Mutações na região do íntron provocam anomalias no local de reconhecimento de ligação a diversos fatores, podendo alterar a regulação do splicing (64,65). Os genes eucariotos contêm sequências não codificantes (íntrons) e regiões codificantes (exóns) que devem ser removidas e unidas, respectivamente, no processo de splicing do precursor de RNA mensageiro (pre-mRNA), para que posteriormente possam ser utilizadas na codificação de proteínas (66). A falha deste processo faz com que o RNAm contenha regiões do íntron e seja traduzido em proteínas totalmente diferentes da proteína original. Esta falha está associada ao desenvolvimento de doenças genéticas humanas (65,66).

O real impacto da deleção encontrada neste estudo não pode ser avaliada, mas sabendo da possibilidade de consequências da deleções na região intrônica, o splicing aberrante nessa região pode reduzir possíveis atividades da telomerase. Algumas pesquisas estudam essa possível relação na busca de investigar o potencial de

manipulação do splicing em *hTERT* na tentativa de melhorar a quimioterapia e medicina regenerativa, além da inibição da atividade da telomerase em células cancerígenas (67,68).

Associando o polimorfismo às variáveis clínicas do estudo, foi encontrada associação significativa para a análise entre os diferentes genótipos e os estadiamento T (Figura 24) e entre a deleção e genótipos GG/AG e tipos de tumor (Figura 25).

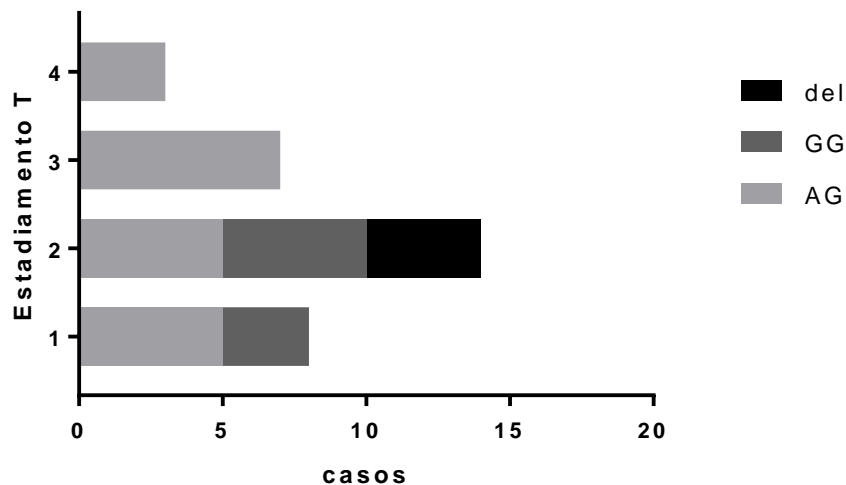


Figura 24 - Associação entre genótipo e estadiamento T do tumor ( $p=0,0491$ ,  $n=32$  e teste do  $X^2$ )

Quanto maior o estadiamento T pior o prognóstico para o paciente (28). O genótipo AG foi o único presente nos estadiamento de pior prognóstico (T3 e T4) e a deleção foi observada em estágio intermediário (T2) – Figura 24. Esta associação não foi encontrada nos estudos pesquisados, tanto para casos com câncer de mama quanto para outros tipos de cânceres. O genótipo GG demonstrou associação com um melhor prognóstico em relação ao tamanho do tumor, já que foi presente em tumores menores. Portanto o genótipo GG e a deleção apresentaram melhor prognóstico para o estadiamento T. Como o resultado mostra uma possível associação clínica, este resultado abre portas para novos estudos, já que este tipo de análise não foi encontrada até então na literatura.

Na Figura 25 é possível ver a associação entre os genótipos com o tipo de tumor.

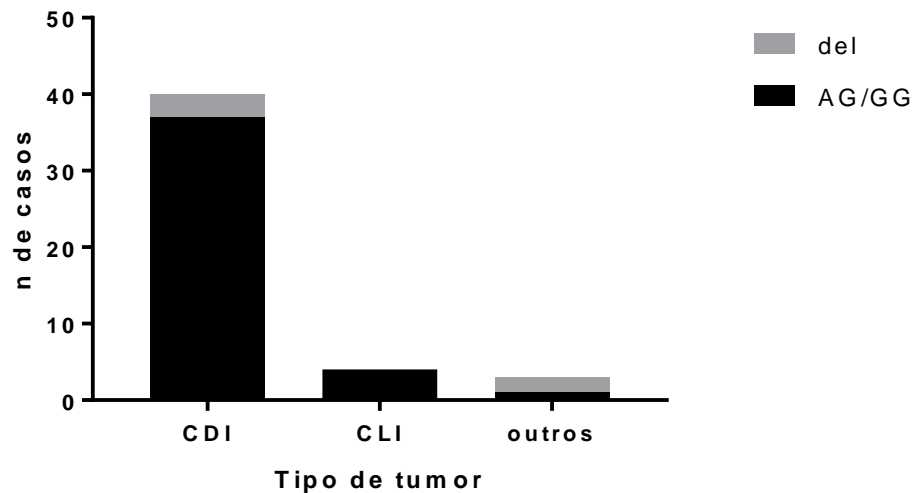


Figura 25 - Associação entre os genótipo GG/AG e deleção ao tipo de tumor ( $p=0,0045$ ,  $n=47$  e teste do  $X^2$ )

Não houve deleção apenas nos casos de CLI. A comparação com outros estudos é impossibilitada pela ausência da descrição da deleção na literatura. Um estudo relatou a maior frequência do genótipo GG em pacientes com CDI (OR = 5,9; IC 95% = 1,3-28,5;  $p = 0,014$ ) (46) mas não fez comparação com os outros genótipos deste trabalho.

Embora muitos trabalhos mostrem uma relação entre o polimorfismo rs2736100 da *hTERT* e vários tipos de câncer (câncer de pulmão, glioma, câncer de bexiga, adenocarcinoma, câncer de próstata, carcinoma basocelular, câncer de pâncreas e carcinomas uroteliais do trato superior (30,36,42,43)) este trabalho encontrou poucas associações deste polimorfismo com aspectos clínicos relevantes no câncer e mama. As limitações pelo pequeno número de amostras e ausência de alguns dados clínicos podem ter prejudicado a análise, já que para o estudo de polimorfismos é importante ter um grupo considerável para o estudo. Entretanto, os resultados deste trabalho (possível presença de uma deleção e algumas associações clínicas) corroboram para alguma significância deste polimorfismo para o câncer de mama.

Apesar do presente trabalho concentrar-se no polimorfismo rs2736100 e na avaliação do seu potencial como marcador prognóstico, o sequenciamento da região intrônica pode revelar outros polimorfismos bem como novas modificações frequentes



nessa população. A análise dessas sequências está em curso para subsidiar novos estudos a esse respeito.

## 5 CONCLUSÃO

A busca por novos marcadores no câncer de mama tenta preencher a lacuna daqueles tumores que não são bem entendidos e definidos com os atuais marcadores, como os triplos-negativos e normal “breast-like”. A definição de um prognóstico claro para o paciente colabora para a escolha do melhor tratamento para aquele caso. Na tentativa de analisar a capacidade do polimorfismo rs2736100 da *hTERT* atuar como marcador prognóstico no câncer de mama, nosso estudo demonstrou que este polimorfismo tem associação com algumas variáveis clínicas e de prognóstico do câncer de mama, mas novos estudos com amostras maiores devem ser realizados. Portanto, este estudo sugere que o polimorfismo rs2736100 da telomerase ainda não deve ser utilizado como marcador prognóstico no câncer de mama, pelo menos na população estudada, pois há necessidade de estudos mais detalhados que possam confirmar seu valor clínico.

Enquanto novos marcadores não são estabelecidos é importante dar continuidade ao uso dos marcadores já utilizados e buscar meios que melhorem sua técnica. Neste trabalho os receptores hormonais e indicadores de proliferação (RE, RP e Ki67) mostraram uma excelente associação com fatores prognósticos, confirmando suas indicações para definição de tratamentos e prognóstico.

## Referencias Bibliográficas

- (1) WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Health topics: Cancer**. Disponível em:<<http://www.who.int/topics/cancer/en/>> Acesso em: 29 out 2013.
- (2) National Cancer Institute. **“Defining Cancer”**. [Atualizado em 2015] Disponível em:<<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>> Acesso em: 02 nov 2016.
- (3) INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é o câncer?** – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)> Acesso em: 28 out 2013.
- (4) National Cancer Institute. **What is Cancer**. [Atualizado em 2014] Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>> 28 out 2013.
- (5) ACS. AMERICAN CANCER SOCIETY. **What Is Cancer?** Disponível em:<<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>> Acesso em: 10 abr 2014.
- (6) Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. **Exp Cell Res**, v. 318, n. 4, p. 299-310, 2012.
- (7) INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. **INCA**, 3ª edição, Rio de Janeiro, 2008.
- (8) BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer. TNM: Classificação de tumores malignos. **INCA**, Rio de Janeiro, 6ª edição, 254 p. 2004.
- (9) ROBBINS, S. L et al. In:\_\_\_\_\_. **Patologia** – Bases patológicas das doenças. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap.7, 2005.
- (10) MENGARDA, F. C. L. **Vivência da mulher portadora de câncer de mama**. 2010. Dissertação, Graduação, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau,. 2010.

- (11) SILVA, J. M. M. **Avaliação de ovários criopreservados por vitrificação ou congelamento lenta após intervalo precoce e tardio de castração em ratas**. 2014. Dissertação, Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- (12) Vieira DSC, Dufloth RM, Schmitt FCL et al. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.30, n. 1, p. 42-47, 2008.
- (13) ALMEIDA, R. S. S. **Análise de mutações e caracterização do gene MYLK4 em carcinomas de mama**. 2014. Dissertação, Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2014
- (14) GOMES, E. A. **Mulheres e câncer de mama: percepção, itinerário terapêutico e prevenção**. 2012. Dissertação, Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.
- (15) BATISTON, A. P. **Deteção precoce do câncer de mama: conhecimentos e pratica de mulheres e profissionais da estratégia de saúde da família em Dourados/MS**. 2009. Dissertação, Doutorado, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.
- (16) BRASIL. Ministério da saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; 2016.
- (17) VICH, P. et al. Actualización del cancer de mama en Atención Primaria (I/V). **Revista SEMERGEN**, Madrid, v. 40, n. 06, p. 326-333, 2014.
- (18) BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Controle do câncer de mama: documento de consenso. **Instituto Nacional do Câncer**, Rio de Janeiro, p. 39, 2004.
- (19) MARINHO, L. A. B. et al. O papel do auto-exame mamário e da mamografia no diagnóstico precoce do câncer de mama. **Revista de Ciências Médicas**, Campinas, v. 11, n. 3, p. 233-242, 2002.
- (20) MOLINA, L.; DALBEN, I.; DE LUCA, L. A. Análise das oportunidades de diagnóstico precoce para as neoplasias malignas de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, CIDADE, v. 49, n. 2, p. 185-190, 2003.

- (21) AMC. American Cancer Society, **Types of breast cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>> Acesso em 05 de fevereiro de 2017.
- (22) SBM. SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA, **Subtipos moleculares do câncer de mama**. Disponível em: <<http://www.sbmastologia.com.br/cancer-de-mama/tipos-cancer-de-mama/subtipos-moleculares-do-cancer-de-mama-18.htm>> Acesso em 13/11/2015.
- (23) AMORIM, A. R. **Genética do câncer**. 2002. Dissertação, Graduação, Centro Universitário de Brasília, Brasília. 2002.
- (24) VILLODRE, E. S. **Influência do Resveratrol, Quercetina e Temozolomida na formação de tumor-esferas em Glioma Humano in vitro**. 2009. Dissertação, Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- (25) ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Fatores prognósticos e preditivos de neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Revista Arquivos de Ciências da Saúde**, São José do Rio Preto, v. 15, n. 4, p. 189-198, 2008.
- (26) PERUZZI, C. P.; ANDRADE, V. R. M. Análise dos marcadores imuno-histoquímicos associados com câncer de mama em mulheres na Região das Missões, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 26, n. 4, p. 181–185, 2016.
- (27) CINTRA, J. R. D. et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, p. 178–187, 2012.
- (28) OLIVEIRA, C. F.; SILVA, T. S. Carcinoma invasivo da mama: do diagnóstico ao tratamento cirúrgico. In: **Manual de Ginecologia**. 1. ed, v. 2, c. 37, p. 247–288, 2009.
- (29) PARK, C. K. et al. Expression level of hTERT is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma. **Oncotarget**, New York, v. 30, n. 5, p. 3399-3407, 2014.
- (30) ZOU, P. et al. The TERT rs2736100 Polymorphism and Cancer risk- a meta-analysis based on 25 case-control studies. **BMC cancer**, v. 12, n. 7, 2012

- (31) GUERRA, M. R. et al. Sobrevida de cinco anos e fatores prognósticos em coorte de pacientes com câncer de mama assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 11, p. 2455-2466, 2009.
- (32) SHEN, J. et al. Genetic polymorphisms in telomere pathway genes, telomere length and breast cancer survival. **Breast Cancer Research and Treatment**, London, v. 134, n. 1, p. 393-400, 2012.
- (33) SBMSP. Assinaturas genéticas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Mastologia Regional de São Paulo**, São Paulo, v. 15, n. 97, 2012.
- (34) FERNANDES, G. S.; CALABRICH, A.; KATZ, A. Câncer de mama triplo-negativo: aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos. **Revista Brasileira de Mastologia**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 76-82. 2009.
- (35) COLTRO, M. L. **Bem jurídico penal e pesquisa com células-tronco embrionárias**. 2007. Dissertação, Graduação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.
- (36) ZHOU, P. et al. Association between telomerase reverse transcriptase rs2736100 polymorphism and risk of glioma. **Journal of Surgical Research**, v. 191, n. 1, p. 156–160, 2014.
- (37) BISOFFI, M.; HEAPHY, C.M.; GRIFFITH, J. K. Telomeres: prognostic markers for solid tumors. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 10, p. 2255–2260, 2006.
- (38) SVENSON, U.; ROOS, G. Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochim Biophys Acta – Molecular Basis of Disease*, v. 1792, n. 4, p. 317–323, 2009.
- (39) HEAPHY, C. M. et al. Shorter telomeres in luminal B, HER-2 and triple-negative breast cancer subtypes. **Journal of Modern Pathology**, New York, v. 24, p. 194-200, 2011.
- (40) SANTOS, P.; FASANO, B.; OKADA, W. A cura do envelhecimento. **Revista Galileu**, n. 235. 2011.

- (41) PELLAT, A. J. et al. Telomere Length, Telomere-Related Genes, and Breast Cancer Risk: The Breast Cancer Health Disparities Study. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 52, n. 7, p. 595-609, 2013.
- (42) YUAN, X. et al. The association between the TERT rs2736100 AC genotype and reduced risk of upper tract urothelial carcinomas in a Han Chinese population. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, 2016.
- (43) CHOI B.J. et al. Influence of the hTERT rs2736100 polymorphism on telomere length in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 31, p. 9328-9336, 2015.
- (44) SHETE, S. et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. **Nature genetics**, v. 41, n. 8, p. 899–904, 2009.
- (45) MAIDA, Y.; MASUTOMI, K. Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase. **Cancer Science**, v. 106, n. 11, p. 1486–1492, 2015.
- (46) OZTAS, E. et al. Association Between Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene Variations and Risk of Developing Breast Cancer. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 20, n. 8, p. 459–464, 2016.
- (47) MYLLER S.A., DYKES D.D. & POLESKY H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, pg. 1215, 1988.
- (48) INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Tipos de câncer: mama**. Disponível em:  
<[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer\\_mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama)> Acesso em: 18 jan 2017.
- (49) JOVITA, R. et al. Câncer de mama no homem: análise dos aspectos epidemiológicos , clínicos e terapêuticos em serviço formal brasileiro. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 10, n. 37, p. 90–96, 2014..
- (50) NOGUEIRA, S.; MENDOANÇA, J.; PASQUALLETE, H. Câncer de mama em homens. **Revista Brasileira Mastologia**, v. 24, n. 4, p. 109–114, 2014.

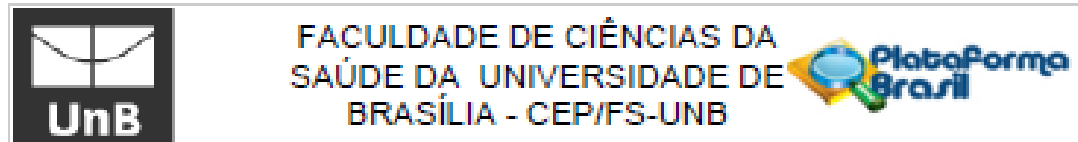
- (51) WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Breast Cancer**. Disponível em:<  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> acesso em 18/01/2016
- (52) POLEDNAK, A. P. Estimating the number of U.S. incident cancers attributable to obesity and the impact on temporal trends in incidence rates for obesity-related cancers. **Cancer Detection and Prevention**, v. 32, n. 3, p. 190–199, 2008.
- (53) WELTI, L. M. et al. Weight Fluctuation and Cancer Risk in Post-Menopausal Women: The Women's Health Initiative. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, p.1-26, 2017.
- (54) SOUZA, N. et al. Associação entre índice de massa corpórea e câncer de mama em pacientes de Salvador, Bahia. **Revista Brasileira Mastologia**, v. 24, n. 3, p. 76–81, 2014.
- (55) BRASIL. MINISTÉRIOS DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil. **INCA**, p. 1-171, 2015.
- (56) ABREU, E. DE; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113–131, 2002.
- (57) NASCIMENTO, J. C. F. **Fut3 no carcinoma ductal invasivo de mama: investigação do promotor gênico e expressão protéica em pacientes do nordeste brasileiro**. 2015. Dissertação, Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2015.
- (58) OUGH, M.; VELASCO, J.; HIEKEN, T. J. A comparative analysis of core needle biopsy and final excision for breast cancer: Histology and marker expression. **American Journal of Surgery**, v. 201, n. 5, p. 685–687, 2011.
- (59) KIM, H. S. et al. Risk Factors Associated with Discordant Ki-67 Levels between Preoperative Biopsy and Postoperative Surgical Specimens in Breast Cancers. **PLoS ONE**, v. 46, p. 1–10, 2016.
- (60) VASCONCELOS, A. B. DE; MENDONÇA, G. A. E. S.; SICHIERI, R. Height, weight, weight change and risk of breast cancer in Rio de Janeiro, Brazil. **São Paulo Medical Journal**, v. 119, n. 2, p. 62–6, 2001.



- (61) ZHANG, B. et al. Height and Breast Cancer Risk: Evidence From Prospective Studies and Mendelian Randomization. **J Natl Cancer Inst**, v. 107, n. 11, p. 1–17, 2015.
- (62) FINSTAD, S. E. et al. Adult height, insulin, and 17 $\beta$ -estradiol in young women. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 18, n. 5, p. 1477–1483, 2009.
- (63) ANGELA, E. et al. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67. Breve revisão. Pós-Grad. **Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**, v. 2, n. 1, p. 54–60, 1999.
- (64) HANNA, N. et al. Et conséquences des mutations. **Medecine Sciences**, v. 21, p. 969-980, 2005.
- (65) WHILEY, P. J. et al. Splicing and multifactorial analysis of intronic BRCA1 and BRCA2 sequence variants identifies clinically significant splicing aberrations up to 12 nucleotides from the intron/exon boundary. **Human Mutation**, v. 32, n. 6, p. 678–687, 2011.
- (66) FENG, D.; XIE, J. Aberrant splicing in neurological diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 4, n. 6, p. 631–649, 2013.
- (67) WONG, M. S. et al. Regulation of Telomerase Alternative Splicing: A Target for Chemotherapy. **Cell Reports**, v. 3, n. 4, p. 1028–1035, 2013.
- (68) WONG, M. S.; SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Regulation of human telomerase splicing by RNA : RNA pairing. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–6, 2014.

## ANEXOS

### ANEXO A



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo de marcadores moleculares associados à resposta de pacientes oncológicos à quimioterapia para uso em terapêutica racional em saúde pública

**Pesquisador:** Diêgo Madureira de Oliveira

**Área Temática:** Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 4

**CAAE:** 30711114.3.0000.0030

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências da Saúde - FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**Patrocinador Principal:** Departamento de Ciência e Tecnologia

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 975.592

**Data da Relatoria:** 03/02/2015

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo Edital FAPDF 03/2014 Programa Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde PPSUS-DF dividido em duas etapas com perspectiva de amostra de 1000 participantes. A primeira retrospectiva, com coleta de informações a partir de prontuários médicos e análise molecular de material fixado e preservado em parafina; a segunda prospectiva, com concomitante coleta de dados clínicos e material biológico para análise molecular e composição de biorepositório. Esquematicamente, as análises serão feitas com o objetivo de cruzar dados clínicos com resultados dos testes moleculares para buscar preditores confiáveis. Espera-se o desenvolvimento de modelos matemáticos de correlação direta, ou de associação de variáveis para composição de modelo de predição. Para tal, a coleta de dados clínicos será efetuada por meio de transferência de informações de prontuário médico para formulários especificamente desenvolvidos para cada tipo de suspeita diagnóstica, uma vez que o desfecho mais relevante é a resposta ao tratamento, que muda de acordo com o tipo de neoplasia. Algumas variáveis, no entanto, como as genéricas idade e sexo, precocidade do diagnóstico ou estadiamento/graduação da lesão neoplásica, constarão em todos os formulários, o que permitirá análises comparativas com

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1847

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 975.592

populações maiores e mais significativas para esses critérios. Todas as informações coletadas integrarão um banco de dados associado ao biorepositório. No banco de dados, constarão informações acerca dos polimorfismos e positividade para os marcadores moleculares do estudo. O banco receberá tratamento estatístico adequado, com valores expressos como média e erro médio padrão, mediana e percentil, ou proporção. A escolha da medida de tendência central e das medidas de dispersão será feita de acordo com a finalidade da análise e a distribuição dos dados em um histograma de frequência. A distribuição será considerada normal se satisfizer as seguintes condições: Apresentar assimetria no intervalo entre -1 e +1 e curtose no intervalo entre -2 e +2; e considerada não normal se satisfizer as seguintes condições: Não passar em qualquer dos testes de normalidade executados ou apresentar assimetria ou curtose fora dos intervalos citados. Para conjuntos de dados representados por média (portanto, com distribuição normal), testes estatísticos paramétricos serão usados nas comparações entre grupos, enquanto

testes não paramétricos serão usados para aqueles representados por mediana (com distribuição não normal). Para comparação de proporções o teste usado será o X<sup>2</sup> e a análise direta de diferença de prevalência entre grupos. O teste usado para cada análise será especificado na apresentação dos resultados. Ao final da análise, espera-se a identificação de marcadores clinicamente úteis para a resposta à terapia de pelo menos um antineoplásico, com determinação de especificidade, sensibilidade, valores preditivos e aplicabilidade. Orçamento R\$ 236.200,00.

#### Objetivo da Pesquisa:

Descrito pelos pesquisadores:

"Objetivo Geral: Validar o uso de biomarcadores associados à resposta à quimioterapia para aperfeiçoar as condutas terapêuticas em oncologia.

#### Objetivos Específicos:

a) Validar o uso do padrão de metilação do promotor do gene da MGMT como biomarcador de susceptibilidade à Temozolomida para guiar a conduta terapêutica em casos de glioma; b) Investigar a associação de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de drogas e a resposta ao tratamento com quimioterápicos para identificação de marcadores de susceptibilidade clinicamente úteis; c) Investigar a associação de polimorfismos em genes relacionados à tumorigênese e o prognóstico dos pacientes para identificação de marcadores diagnósticos clinicamente úteis; d) Criação e manutenção de banco de DNA para estudos de polimorfismo em oncologia baseados em população local; e) Disponibilização das técnicas validadas no estudo para utilização nas redes de atenção à saúde do Distrito Federal; f) Formação de recursos humanos na área."

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

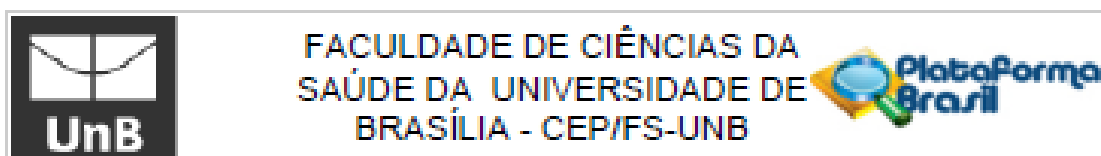
CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 575.592

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Descritos pelos pesquisadores:**

**Riscos:** As metodologias empregadas não oferecem risco à integridade emocional, psicológica ou socioeconômica dos indivíduos voluntários do estudo. O risco à integridade física é mínimo, e é inerente ao processo de coleta de amostra de sangue periférico (principalmente desconforto). A coleta será efetuada por profissional de saúde treinado e experiente, e quando for o caso, será aproveitado o momento de coleta de sangue para exames diagnósticos, evitando a duplicidade do procedimento.

**Benefícios:** Individual: Informações adicionais ao diagnóstico que poderão ser úteis na escolha da conduta terapêutica. Tais informações serão oriundas de exames moleculares inacessíveis de outra

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma emenda do projeto original cujas modificações seguem elencadas em documento anexo à Plataforma:

- I- Inclusão de membro colaborador, João Nunes de Matos Neto.
- II- Inclusão de nova instituição coparticipante, CETTRO – Centro de Tratamento Oncológico LTDA.
- III- Menção à nova instituição coparticipante na metodologia (coleta de dados)
- IV- Adição de termo de concordância assinado por representante legal da nova instituição coparticipante.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentos apresentados para apreciação de emenda a projeto:

Informações Básicas do Projeto - "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_449842\_E1.pdf", postado em 16/12/2014;

"Encaminhamento de emenda.pdf", postado em 16/12/2014;

"Termo de concordância da nova instituição coparticipante.jpg", postado em 16/12/2014;5

"Lattes Joao Nunes.pdf", postado em 16/12/2014.

#### **Recomendações:**

Não se aplica.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Trata-se de Inclusão de instituição coparticipante, Cettro – Centro de Tratamento

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

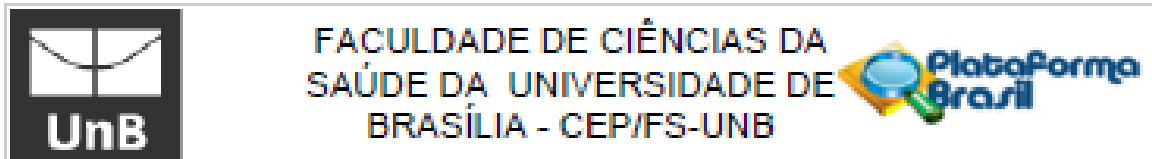
CEP: 70.910-600

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (81)3157-1947

E-mail: cep@unb@gmail.com



Continuação do Parecer: 575.592

Oncológico LTDA, e de seu chefe João Nunes de Matos Neto.

Protocolo de pesquisa em conformidade com a Res. CNS 466/2012 e complementares.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa inicial.

BRASILIA, 06 de Março de 2015

---

Assinado por:  
**Maria Togashi**  
 (Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-600  
 UF: DF Município: BRASILIA  
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com

## ANEXO B

*Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE*

O(A) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto "Estudo de marcadores moleculares associados à resposta de pacientes oncológicos à quimioterapia para uso em terapêutica racional em saúde pública". O presente documento contém informações importantes sobre o estudo, caso não se sinta esclarecido(a), ou tenha qualquer dúvida durante a leitura, poderá solicitar explicações adicionais.

Resumidamente, trata-se de um estudo científico que visa desenvolver novos testes de laboratório para ajudar na escolha do melhor medicamento a ser usado em pacientes com câncer. Para isso, serão estudadas amostras de DNA extraído a partir de sangue coletado dos voluntários, assim como os dados de evolução clínica registrados em prontuário médico referentes à resposta aos tratamentos aplicados.

Ao aceitar participar do estudo, o único desconforto ao qual será submetido é a coleta de sangue por punção de veia periférica, procedimento que envolve baixo risco, mas moderado grau de desconforto físico. Assim, ao assinar este termo, o(a) Senhor(a) autorizará a coleta de 4 mL de sangue, que será feita por profissional qualificado, em ambiente adequado e com material estéril e descartável, a fim de minimizar qualquer risco de dano físico, além do acesso da equipe de pesquisadores aos dados no seu prontuário médico. O acesso aos resultados obtidos com o estudo, bem como informações e orientações que possam resultar em reavaliação de conduta terapêutica, aconselhamento genético ou qualquer outro benefício direto, é garantido a todos os participantes.

O(A) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa, poderá fazer contato com a equipe caso precise de assistência em relação aos procedimentos utilizados no estudo, ou sempre que julgar necessário, e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a participar do estudo, ou desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração, assim como não haverá também despesa de qualquer natureza.

É garantido o seu direito de reivindicar indenização diante de eventuais danos decorrentes da participação no estudo.

O sangue coletado, após processado, irá compor biorepositório (será armazenado para fins de pesquisa), e poderá ser usado futuramente para estudos de polimorfismo (a exemplo do descrito nesse documento), em conjunto com as informações clínicas obtidas por meio de análise de prontuário médico. Não faz parte da metodologia do estudo o rastreamento do indivíduo doador do material e das informações.

Para solicitar qualquer informação a respeito da pesquisa, deve-se fazer contato com o responsável pelo estudo, professor Diégo Madureira de Oliveira, através do e-mail [dmadureira@unb.br](mailto:dmadureira@unb.br), pelo telefone institucional (61) 3107 1998, ou no endereço "FCE – Faculdade de Ceilândia - Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Universidade de Brasília, CEP: 72220-900". O projeto foi aprovado pelo CEP/FS-UnB (Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília – DF, telefone (061) 3107-1947 e-mail: [cepfs@unb.br](mailto:cepfs@unb.br)). Esse TCLE está em duas vias (uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) Senhor(a), o sujeito da pesquisa) e foi elaborado segundo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) N° 466, de 12 de dezembro de 2012, especialmente em seu item IV.3, cujas exigências o responsável pelo projeto compromete-se a seguir; e à luz da Resolução CNS N° 441 de 12 de maio de 2011 para composição de biorepositório.

---

 Nome / assinatura

---

 Pesquisador Responsável  
 Nome e assinatura

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

## ANEXO C



## VAUCHER PARA AUTORIZAÇÃO DE EXAMES – NAP

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

NOME DO PACIENTE:

DATA DE NASCIMENTO:

PESQUISA: "Análise do polimorfismo da telomerase e expressão da enzima no tecido tumoral como fatores prognósticos para o câncer de mama".

PESQUISADOR: Dr. Diego Madureira de Oliveira (CRM 1059783)

Solicitação:

**Nome do Exame**

Coleta de tubo de sangue EDTA

**Código**

EDTANAP

Convênio: 3491 – BSB-IS NAP KATHERINE RODRIGUES

O tubo com o sangue poderá ser colhido em qualquer unidade do laboratório Sabin.

Recepção: Por favor desconsidere a data de entrega do resultado, para essa pesquisa não há resultado. É coletado somente um tubo de sangue que será entregue ao pesquisador, para que os exames possam ser realizados na UnB. Nós do Sabin não iremos realizar exames, somente a coleta do tubo.

Mandar esse tubo separado aos cuidados de Evanuzia – Triagem escrito "Material pesquisa NAP – tubo EDTA)"

Guia deve ser mandada no envelope para Simone Lima - NAP

Dúvidas: Simone Lima  
NAP  
(61) 3329-8000 (ramal 3217)  
e-mail: [simonelima@sabin.com.br](mailto:simonelima@sabin.com.br)